MESSUNG VON BLUTGRUPPENANTIGENEN AUF EINZELNEN ERYTHROZYTEN DURCH QUANTITATIVE PHOTOMETRISCHE IMMUNAUTORADIOGRAPHIE

Klaus Kissling

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535715_0016

Aus dem Institut für Hämatologie der
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
München

MESSUNG VON BLUTGRUPPENANTIGENEN AUF EINZELNEN ERYTHROZYTEN DURCH QUANTITATIVE PHOTOMETRISCHE IMMUNAUTORADIOGRAPHIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Kissling
aus
Schwäbisch Hall

Jahr
1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.S.Thierfelder

Mitberichterstatter: Prof.Dr.W.Wilmanns

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3.4.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 09 0 9 0

Herrn Prof.Dr.med,S.Thierfelder danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit,die vorliegende Arbeit in der Abteilung Immunologie des Institutes f.Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH,München durchführen zu können.

Herrn Dr.med.E.Thiel danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Danken möchte ich ferner Herrn Dr.habil.M.Eulitz für die Präparation der Antiseren und Herrn Diplomphysiker W.Ruppelt für seine Hilfe bei der Erstellung der Histogramme.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	MATERIAL UND METHODEN	
I.	Medien	6
II.	Bestimmung der Blutgruppe des Spenders	7
III.	Zellpräparation	
	1. Frische und fixierte Erythrozyten	8
	2. Erythrozyten unterschiedlicher Dichte	9
	3. ^{125}J-Standardzellen	10
IV.	Antiseren	
	1. Immunisierung	11
	2. Bestimmung des Agglutinationstiters	11
	3. Absorption	13
	4. IgG-Fraktion	13
	5. Radiojodination der Antikörper	14
V.	Markierung von Zellen mit radiojodinierten Antikörpern	17
VI.	Herstellung der Autoradiogramme	
	1. ^{125}J-Standard	17
	2. Zellausstriche	18
	3. Fixierung in Methanol	18
	4. Filmbeschichtung und Exposition	18
	5. Filmentwicklung	19
	6. Fixation	19
	7. Färben und Differenzieren der Autoradiogramme	20

Seite

VII. Photometrische Messung der Silberkörner
1. Meßapparatur 20
2. Meßvorgang 21
3. Registrierung der Meßwerte 22
4. Eichen des Photometers 22
5. Auswahl der Zellen 23
6. Background-Messungen 23

VIII. Absolute Quantifizierung von membrangebundenen Antikörpern 23

C. ERGEBNISSE

I. Entfernung nicht zellgebundener Radioaktivität 25

II. Auswirkungen der Fixierung von Erythrozyten
1. Vergleichende Untersuchung von frischen und fixierten Erythrozyten 26
2. Verminderung der unspezifischen Bindung von Antikörperprotein 29
3. Haltbarkeit der fixierten Erythrozyten 31

III. Bestimmung des Sättigungsbereiches 33

IV. Verhältnis der Antikörperbindung von A_1- und A_2-Erythrozyten 36

V. Quantitative Ausprägung des Blutgruppenantigens A auf Erythrozyten verschiedener Spender

1. Normalpersonen
a. A_1-Erythrozyten 38
b. Antigenausprägung in Abhängigkeit vom Alter des Spenders 42
c. A_1B-Erythrozyten 44

Seite

d. A_2-Erythrozyten 45
e. A_2B-Erythrozyten 46
f. Variationsbreite von Antigendichten innerhalb einer Zellpopulation 46
g. Variationsbreite von Antigendichten innerhalb eines Spenderkollektivs 51
h. Vergleich der A-Antigendichten von Erwachsenen und Neugeborenen 53
i. Indirekte Markierung von Erythrozyten 54

2. Patienten mit Erkrankungen des Blutes und/oder der blutbildenden Organe

a. Akute lymphatische Leukämie 55
b. Chronische lymphatische Leukämie 59
c. Myeloische Leukämien 60
d. Akute undifferenzierte Leukämie 62
e. Polycythaemia vera 66
f. Aplastische Anämie 70

3. Vergleich der Antigenausprägung bei Normalpersonen und Patienten 74

4. Patienten nach Knochenmarkstransplantation 77

5. Natürlicher Chimärismus 78

6. Erythrozyten unterschiedlicher Dichte 81

7. Antigenausprägung und Geschlecht des Spenders 85

D. DISKUSSION 86

E. ZUSAMMENFASSUNG 120

F. LITERATURVERZEICHNIS 123

A. EINLEITUNG

Im Jahre 1900 stellte der Wiener Forscher Karl LANDSTEINER fest, daß rote Blutkörperchen, auch von gesunden Menschen, häufig agglutinierten, wenn man sie mit dem Serum anderer Menschen vermischte. Landsteiner konnte 3 Isoagglutinine als individuelle Eigenschaften unterscheiden und schloß: "...daß die angeführten Beobachtungen die wechselnden Folgen therapeutischer Menschenbluttransfusionen zu erklären gestatten" (1). Zuvor hatte man das Auftreten von Transfusionszwischenfällen wie die Hämolyse stets nur mit der Grundkrankheit des Empfängers in Verbindung gebracht.
1902 entdeckten Landsteiners Schüler DECASTELLO und STÜRLI mit der Blutgruppe AB eine vierte, die durch das Fehlen jeglicher Isoagglutinine gekennzeichnet ist (1,2,).

Zwischen den Jahren 1908 und 1910 wurde die Vererbung der Blutgruppen vermutet (OTTERBACH und EPSTEIN; v. DUNGERN und HIRSZFELD), aber auch angezweifelt (BATESON). 1924 zeigte BERNSTEIN die Vererbung der ABO-Blutgruppen mathematisch exakt auf.
Bereits 1927 wurden von LANDSTEINER zwei weitere Blutgruppensysteme, nämlich das MN-System und das P-System entdeckt.

Die Entdeckung des Rh-Blutgruppensystems durch LANDSTEINER/WIENER und LEVINE/STETSON in den Jahren 1939/40 hat nach der Entdeckung des ABO-Systems sicherlich die größte Bedeutung, besonders als Ursache von Transfusionszwischenfällen bei bestehender ABO-Kompatibilität und dem als Erythroblastosis fetalis beschriebenen Symptomenkomplex bei Rh-Inkompatibilität zwischen Mutter und Frucht.

In den darauffolgenden Jahren wurde noch eine große Anzahl weiterer Blutgruppensysteme und Untergruppen gefunden. Die Gesamtzahl der heute identifizierbaren Blutgruppenantigene ist auf mehr als 100 angestiegen (3).

Einige der Blutgruppenantigene wurden jedoch nicht ausschließlich auf Erythrozyten nachgewiesen, sondern man gelangte bald zu der Ansicht, daß sie nicht nur auf weiteren im Blut zirkulierenden Zellen wie Leukozyten und Thrombozyten vorhanden sind, sondern überhaupt im ganzen menschlichen Organismus, mit Ausnahme des Bindegewebes, des Zentralnervensystems und einiger epithelialer Strukturen (4), weit verbreitet sind.

Weiterhin konnten die ABH-Blutgruppensubstanzen bei vielen Tierarten, Bakterien und auch einigen Pflanzen gefunden werden.

Mit der Entdeckung der Untergruppen A_2 (v. DUNGERN/ HIRSZFELD 1911) und A_3 (FRIEDENREICH 1936) gewann die Frage um die Natur der unterschiedlichen Ausprägung dieses Blutgruppenmerkmals immer größeres Interesse. Besonders seit 1960 versuchten verschiedene Forschergruppen antigene Bindungsstellen für Blutgruppenantikörper quantitativ zu erfassen.

Die dabei gefundenen Werte weichen zum Teil erheblich voneinander ab. BOYD et al. (5) untersuchten die Zahl der antigenen Bindungsstellen mit Hilfe des Radioimmunoassays unter Verwendung eines ^{131}J-markierten Limabohnenlectins und errechneten 10 000 000 antigene Bindungsstellen auf A_1-Erythrozyten und 7 000 000 auf A_2-Erythrozyten.

Deutlich weniger Bindungsstellen, nämlich 1 034 000 für A_1-Erythrozyten und 260 000 für A_2-Erythrozyten, fanden ECONOMIDY et al. (6) mit Hilfe der Technik des

Radioimmunoassays unter Verwendung eines ^{125}J-markierten Anti-A-IgG vom Kaninchen.

War man anfänglich noch der Meinung, daß die Antigene auf Erythrozyten der Phänotypen A_1 und A_2 lediglich in quantitativer Hinsicht Unterschiede aufweisen, so gelangte man im Laufe der Zeit immer mehr zu der Einsicht, daß auch qualitative Unterschiede bestehen. So ist man heute allgemein der Ansicht, daß A_1-Erythrozyten die Antigene A und A_1, A_2-Erythrozyten lediglich das Antigen A besitzen.
Dennoch ist bis heute die Frage, ob es sich um quantitative (7,8,9), quantitative und qualitative (5,10) oder nur qualitative Unterschiede (6,11,12, 13,14) handelt, nicht unumstritten.

Die Ausprägung der Blutgruppenantigene auf Erythrozyten bleibt jedoch beim einzelnen Individuum nicht während des ganzen Lebens gleich; so ist zum Beispiel einerseits unmittelbar nach der Geburt ein Ansteigen der Antigendichte (15-20), andererseits bei verschiedenen Erkrankungen, besonders im Falle der Leukämien, oft eine Abnahme der Antigendichte festzustellen (Zusammenfassung der Lit. bei GOLD, 21).

Auch bleibt während der Ausdifferenzierung des Proerythroblasten zum Erythrozyten die Blutgruppenantigendichte nicht konstant, sondern ist, im Sinne eines Anstieges bis zur Differenzierungsstufe des orthochromatischen Erythroblasten und einer nachfolgenden leichten Verminderung der Blutgruppenantigene auf der Zellmembran (22), Veränderungen unterworfen.

In sehr seltenen Fällen können die Erythrozyten eines Menschen sogar verschiedene Blutgruppenzugehörigkeit aufweisen, so zum Beispiel bei natürlichen Chimären, beim Empfänger einer blutgruppenungleichen, therapeutischen Knochenmarkstransplantation und bei

Chimärismus im Verlaufe von leukämischen Erkrankungen (23).

In der vorliegenden Arbeit soll die Ausprägung des Blutgruppenantigens A auf Erythrozyten von gesunden Spendern und Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des Blutes und/oder der blutbildenden Organe untersucht werden.
Um eine quantitative Messung des Blutgruppenantigens auf e i n z e l n e n Zellen zu ermöglichen, wird als Untersuchungsmethode die Quantitative ^{125}J-Autoradiographie angewandt. Hierbei werden die Erythrozyten mit radiojodinierten Antikörpern inkubiert und autoradiographiert. Durch photometrische Messung der Anzahl der gebildeten Silberkörner über den Zellen kann im Vergleich zu einem radioaktiven Standard die Radioaktivität einzelner Zellen gemessen werden (THIEL, 24,25).
Diese Radioaktivität wird von der Anzahl der ^{125}J-markierten Anti-A-Moleküle bestimmt und gibt damit Auskunft über die Zahl der Antikörpermoleküle, die an die Zellmembran gebunden wurden.

Diese empfindliche Technik erlaubt also Messungen antigener Bindungsstellen auf dem Einzelzellniveau. Darüberhinaus ermöglicht es die kurze Dauer des Meßvorgangs eine große Anzahl von Erythrozyten (1000 und mehr pro Spender) mit vertretbarem Zeitaufwand zu untersuchen. Dadurch können auch Aussagen über das Verteilungsmuster der Antigendichten innerhalb einer Erythrozytenpopulation gemacht werden.

Andere Techniken, die bisher häufig zu quantitativen Untersuchungen von Membranantigenen eingesetzt wurden, wie Radioimmunoassay oder Elektronenmikroskopie nach Ferritin- oder Goldmarkierung antigener Bindungsstellen auf der Zellmembran, besitzen diese Vorteile nicht.

Untersuchungen mit Hilfe des Radioimmunoassays erlauben lediglich Aussagen über den Mittelwert der Anzahl antigener Bindungsstellen innerhalb einer großen Zellzahl. Über die von Zelle zu Zelle unterschiedliche Antigenausprägung erhält man mit dieser Technik keine Hinweise, das Vorhandensein verschiedener Zellpopulationen in einem Spenderblut, wie es zum Beispiel beim Chimärismus vorkommt, bleibt unerkannt.

Bei der elektronenoptischen Auszählung von membrangebundenen Ferritin- oder Goldpartikeln ist die Zahl der zu untersuchenden Zellen durch den hohen Zeitaufwand limitiert; außerdem werden lediglich kleine Ausschnitte der Zellmembran untersucht, wobei in der Berechnung der absoluten Molekülzahl die eingesetzten Werte für die Schnittdicke des Präparates und die Gesamtoberfläche eines Erythrozyten weitere Fehlerquellen darstellen können.

Da die etwas unglückliche Bezeichnung "Anti-A" mit ihren zwei Bedeutungen - nämlich einerseits für das gesamte Antiserum, andererseits für einen der Antikörper im Serum - Anlaß für Mißverständnisse sein könnte, muß hier erwähnt werden, daß die Anti-A-Seren der vorliegenden Untersuchung beide Antikörper, Anti-A und Anti-A_1, enthielten.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Medien

Für die Waschungen von Erythrozyten wurde 0,1 molare phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung pH 7,0 (PBS = phosphate buffered saline) verwendet.
Nach der Markierung von Zellen mit radiojodinierten Antikörpern wurden Waschungen mit Rinderalbumin in einer Konzentration von 6 % bis 100 % in PBS durchgeführt, um nicht zellgebundene Antikörperaktivität besser zu entfernen und um zu verhindern, daß die Zellen an der Wand der Reagiergefäße anhaften. Außerdem läßt sich hierdurch eine bessere Qualität der Zellausstriche auf dem Objektträger erzielen.
Die Rinderalbuminlösung wurde wie folgt hergestellt: Ca. 5 Liter Rinderblut wurden vor dem Töten eines Tieres auf dem Schlachthof aus der V.jugularis gewonnen. Nach dem Abzentrifugieren der zelligen Bestandteile des Blutes wurde dem Serum Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 330 Gramm pro Liter zugesetzt, um die Globuline zu fällen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand unter mehrmaligem Wechsel der Dialysierflüssigkeit 72 Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert und die sulfatfreie Rinderalbuminlösung 30 Minuten bei 63° Celsius inaktiviert, steril filtriert (Druckfilter Sartorius, Göttingen), portioniert und eingefroren. Unmittelbar vor Verwendung wurde das Rinderalbumin aufgetaut und mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

II. Bestimmung der Blutgruppe des Spenders

1-2 ml Venenblut wurde durch Abnahme in EDTA-Röhrchen oder durch Zusatz von Heparin (0,1 ml Heparin 5000 USP/E pro ml auf 10 ml Blut) ungerinnbar gemacht. Nach einmaligem Auswaschen des Blutes in 10 ml phosphatgepufferter, isotoner Kochsalzlösung (PBS) wurde die Zellaufschwemmung bei 1500 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten lang zentrifugiert (Heraeus-Christ Labofuge II) und der Überstand anschließend mit einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette abgesaugt.

Für die Bestimmung der Blutgruppe des Spenders wurden folgende Testseren der Fa. Hyland (Div. Travenol Lab., INC., Costa Mesa, Calif. 92626, U.S.A.) verwendet:

Anti-A (human)
Anti-B (human)
Anti-A,B (human)
Anti-A_1-Lectin, purified
Anti-H-Lectin, purified

In die eingeschliffenen Mulden einer Glasplatte wurde je ein Tropfen der Blutgruppentestseren Anti-A, Anti-B, Anti-A,B und Anti-A_1-Lectin vorgegeben. Ein Tropfen der einmal gewaschenen Erythrozyten wurde mit einem Plastikstäbchen mit diesen Testseren vermischt und die Platte weiterhin von Hand bewegt. Die Beurteilung der Agglutination erfolgte makroskopisch und spätestens nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur.
Die Blutgruppenbestimmung mit Anti-H-Lectin wurde in folgender Weise durchgeführt:
In ein Eppendorf-Reagiergefäß wurden 2 Tropfen Anti-H-Lectin einpipettiert, in ein zweites 2 Tropfen physiologische NaCl-Lösung als Kontrolle. Nach Zugabe eines Tropfens einer 5 %igen Erythrozytensuspension und guter Durchmischung auf einem Eppendorf Rotationsmischer wurde die Suspension nach einer Inkubations-

zeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur 20 Sekunden lang bei 3400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Hettich Micro Rapid). Danach wurde das Zellsediment durch leichtes Schütteln der Eppendorfgefäße etwas aufgewirbelt und eine möglicherweise eintretende Agglutination makroskopisch beurteilt. Um bei der Bestimmung der Blutgruppe von Neugeborenen (Nabelschnurblut) mögliche Fehler auszuschließen, wurden in diesen Fällen auch die Blutgruppen der Eltern ermittelt.

III. Zellpräparationen

1. Präparation von fixierten und unfixierten Erythrozyten.

0,5 bis 1,0 ml gepackte, frische Erythrozyten wurden nach dreimaligem Auswaschen in PBS in 10 ml einer 0,25 %igen Glutaraldehydlösung (Glutaraldehyd, reinst, wässr. Lösg., 25 %, Serva Feinbiochemica Heidelberg) resuspendiert und 30 Minuten fixiert. In einigen Versuchen wurde die Glutaraldehydkonzentration von 0,05 % bis 10,0 % variiert, um besondere Fixationseffekte zu untersuchen.
Um eine ständige Durchmischung von Erythrozyten und Glutaraldehydlösung zu gewährleisten, wurde die Suspension während der Fixation auf einem elektrischen Rüttler (Köttermann Type 4020) ständig in Bewegung gehalten. Mit 3 weiteren Waschungen in PBS wurde überschüssiges Glutaraldehyd entfernt. Nach Zusatz eines Tropfens einer 1 %igen Merthiolatlösung konnten die in 5 ml PBS suspendierten Erythrozyten bei 4° C mehrere Monate lang aufbewahrt werden.
Bei Verwendung von unfixierten Erythrozyten wurden diese lediglich dreimal in PBS gewaschen und maximal 24 Stunden aufbewahrt.

2. Erythrozyten unterschiedlicher Dichte.

Zur Untersuchung von jungen (geringere Dichte) und alten (höhere Dichte) Erythrozyten auf ihre Antigenausprägung wurde eine Dichtetrennung nach einer modifizierten Methode von RENTON (26) durchgeführt, die eine ausreichende Anreicherung von jungen und alten Erythrozyten erbringt. Dazu wurden 40 ml heparinisiertes Blut in 4 Zentrifugengläsern 10 Minuten bei 280 g zentrifugiert und das thrombozytenhaltige Plasma abgesaugt. Von den Säulen der gepackten Erythrozyten wurden jeweils ein Viertel der unten am Röhrchenboden liegenden Zellen gesammelt und 2 Stunden bei 22 000 g zentrifugiert.
Nach dieser Ultrazentrifugation bildeten die Leukozyten eine zusammenhängende Haut, die bei schräg gehaltenem Röhrchen mit einer Pinzette leicht entfernt werden konnte. 10 % von den Erythrozyten aus dem oberen Teil der Säulen und 10 % von den Erythrozyten aus dem untersten Teil wurden in PBS suspendiert, dreimal gewaschen, in Glutaraldehyd fixiert und nach drei weiteren Waschungen bei 4° C aufbewahrt.

3. ^{125}J-Standardzellen

Die Verwendung von ^{125}J-markierten Humanerythrozyten als radioaktive Referenzquelle in der Autoradiographie wurde von THIEL et al. (25) beschrieben.

Die Radiojodination von Erythrozyten wurde mit H_2O_2 unter Verwendung von Lactoperoxidase als Katalysator durchgeführt (27,28).

Humanerythrozyten wurden sechsmal mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 15 x 10^6 Zellen/ml PBS eingestellt. 0,5 mg Lactoperoxidase (Calbiochem., San Diego, Calif., U.S.A.) wurde pro ml Erythrozytensuspension zugegeben und auf einem Magnetrührer darin gelöst.
Durch Zugabe von 200 bis 400 µCi ^{125}J und dreimaligem Hinzufügen von je 0,02 ml einer 0,03 %igen H_2O_2-Lösung (Perhydrol, 30 % H_2O_2, Merck Darmstadt) im Abstand von drei Minuten wurden die Erythrozyten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln jodiniert. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml eisgekühltem 0,025 molarem Natriumazid in PBS gestoppt. Nach zwei Waschungen in PBS wurden die Erythrozyten 30 Minuten mit einer 1,5 %igen Glutaraldehydlösung unter ständigem Schütteln der Suspension fixiert und anschließend noch zweimal mit PBS gewaschen. Die Erythrozyten wurden in PBS resuspendiert und konnten bei 4° C mehrere Wochen aufbewahrt werden.
Um zu vermeiden, daß bei der Bestimmung der Zellkonzentration nach Radiojodination die radioaktiv markierten Erythrozyten ausgezählt werden mußten (Kontamination der Zählkammer, Strahlenexposition des Untersuchers), wurden zwei "kalte" Kontrollansätze, d.h. ohne Zugabe von ^{125}J, in der gleichen Weise behandelt und der Mittelwert der Zellkonzentrationen dieser Ansätze für die folgenden Berechnungen verwendet.

Die Radioaktivität der Standardzellen wurde in einem Gamma-Counter (Packard, U.S.A.) gemessen. 5 Proben zu je 0,02 ml der Standarderythrozytensuspension wurden gemessen und die Werte nach Abzug des Leerwertes arithmetisch gemittelt. Durch Bildung des Quotienten

$$\frac{\text{Zerfälle pro Minute (cpm)/0,02ml Susp.}}{\text{Zellzahl/0,02 ml Susp.}}$$

erhält man den Wert für die radioaktiven Zerfälle in der Minute, die durch e i n e Standardzelle verursacht werden (cpm/Standarderythrozyt).

IV. Antiseren

Es wurden verschiedene heterologe Anti-A-Immunglobuline verwendet, die durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen wurden.

1. Immunisierung

Zur Herstellung von heterologen Anti-A-Seren wurden mehrere Kaninchen mit gewaschenen menschlichen A_1-Erythrozyten immunisiert. Die Grundimmunisierung bestand aus einer einmaligen Injektion von 100 x 10^6 Erythrozyten in 3 ml physiologischer NaCl-Lösung in die Ohrvene. In wöchentlichem Abstand erfolgten zwei Boosterungen durch Injektion von je 100 x 10^6 Erythrozyten. 5 Tage nach der letzten Boosterung wurden die Tiere entblutet.

2. Bestimmung des Agglutinationstiters durch passive Hämagglutination

Nach der Entblutung der Kaninchen wurde durch Zentrifugation das Serum gewonnen und 1 Stunde bei 56° C

inaktiviert. Zur Bestimmung des Agglutinationstiters durch passive Hämagglutination wurde in Mikrotiterplatten mit Spitzboden eine Verdünnungsreihe des Serums angesetzt und jeweils 0,1 ml der jeweiligen Serumverdünnung mit einem Tropfen einer 2 %igen A_1- bzw. 0-Erythrozytensuspension vermischt. Die Ansätze wurden nach kurzer, gründlicher Durchmischung zwei Stunden lang ruhig stehen gelassen und dann abgelesen. Wie groß die individuellen Unterschiede bezüglich der Immunantwort auf die Immunisierung waren, zeigen die Resultate einer Gruppe von Tieren in Tabelle 1.

Tab. 1 Agglutinationstiter von 6 Kaninchenseren (A-F) gegen menschliche Erythrozyten der Blutgruppe A_1 und 0 nach Immunisierung mit A_1-Erythrozyten, vor und nach Absorption mit 0-Erythrozyten. Nur die mit "x" gekennzeichneten Seren wurden absorbiert.

SERUM VON KANINCHEN	VOR ABSORPTION		NACH ABSORPTION	
	A_1	0	A_1	0
^{x}A	512	256	4	0
^{x}B	512	4	256	0
C	2048	2048	-	-
D	16384	16384	-	-
^{x}E	4096	2048	4	0
F	1024	4096	-	-

Zwischen A_1- und 0-Eigenschaften konnten lediglich die Tiere A, B und E unterscheiden (in Tab. 1 mit "x" gekennzeichnet), während die Tiere C, D und F wohl ausschließlich Anti-Spezies-Antikörper gebildet hatten. Weiter verwendet werden konnte aber nur das Serum des Tieres B, da dieses auch nach Ab-

sorption mit O-Erythrozyten noch einen Titer von 1:256 gegen A_1-Erythrozyten aufwies, während bei den Seren der Tiere A und E mit Titern von 1:4 nach Absorption die Anti-A-Aktivität zu gering war.

3. Absorption

Jeweils 2 Teile Kaninchenserum wurden mit 1 Teil dreimal gewaschener, gepackter O-Erythrozyten 30 Minuten bei 4° C unter Schütteln absorbiert, bis O-Erythrozyten nicht mehr agglutiniert wurden. Dies war bei Seren, die wie das Serum des Tieres B in Tab. 1 gut zwischen A_1 und O diskriminierten, in der Regel nach 1 - 2 Absorptionen der Fall.

4. Isolierung der IgG-Fraktion aus dem Serum

Zunächst wurde das Serum mit aqua bidest. im Verhältnis 1:1 verdünnt. Durch Zusatz von 82 Teilen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung, pH 7,2, zu 100 Teilen Serumverdünnung wurden die Globuline ausgefällt und durch Zentrifugation bei 10 000 Umdrehungen/min für die Dauer von 20 Minuten von der flüssigen Phase getrennt. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment dreimal mit 45 %iger Ammoniumsulfatlösung, pH 7,2, gewaschen und in 0,02 molarem Phosphatpuffer, pH 8,0, aufgenommen. Diese Proteinlösung wurde nach dreimaliger Dialyse gegen je 5 Liter Phosphatpuffer an DEAE-Cellulose chromatographiert. Die IgG-Fraktion wurde nach Einengung durch Ultrafiltration erneut gegen gepufferte NaCl-Lösung dialysiert, auf einen Proteingehalt von 10 mg/ml eingestellt, portioniert und bei ca. -20° C aufbewahrt.

5. Radiojodination der Antikörper

Die Antikörper wurden nach der von HUNTER und GREENWOOD 1962 für Hormone eingeführten Chloramin-T-Methode (29), die durch McCONAHEY und DIXON 1966 für Immunglobuline modifiziert wurde (30), mit Jod-125 markiert. Dabei wurden geringere Chloramin-T-Konzentrationen und eine längere Reaktionszeit angewandt, um eine ausreichende Jodination bei Vermeidung von Denaturierung zu erreichen. Mit max. 0,5 ml wurden dabei auch geringere Volumina jodiniert.

Nach dem Auftauen wurden dem Antiserum 1 mCi Na-^{125}J pro mg Antikörperprotein (NEN, New England Nuclear, Großbritannien) zugesetzt und die Proteinmoleküle durch zehnmalige Zugabe von 0,01 ml Chloramin-T (Chloramin-T, Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 100 mg/100 ml unter ständigem Schütteln jodiniert. Die Zugabe des Chloramin-T erfolgte im Abstand von jeweils 60 Sekunden. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml Natriumdisulfit (Natriumdisulfit trocken z. Analyse, Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 200 mg/100 ml gestoppt.
Nicht proteingebundenes Jod wurde durch Gelfiltration über eine ca. 20 cm lange Sephadex-G-20-Säule (Sephadex G-20, fine, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) abgetrennt. Zuvor wurde die Sephadex-Säule mit 2 Tropfen bovinem Serumalbumin vorgesättigt (29,31), was eine nachfolgende Ausbeute von ca. 80 % des eingesetzten Proteins ermöglichte.
Nach der Zugabe von BSA zur Vorsättigung wurde 20 Minuten eluiert, um überschüssiges Protein zu entfernen. Die Antikörperpräparation wurde mit 0,1 M PBS, pH 7,2, eluiert. Das Eluat wurde je nach Tropfgeschwindigkeit über 120-160 Minuten in 30-40 getrennten Fraktionen aufgefangen. Jeder Fraktion wurden 0,02 ml

entnommen und die Radioaktivität dieser Proben im Gamma-counter (Packard, U.S.A.) gemessen. Trug man nun die counts pro Minute (cpm) als Maß der Radioaktivität gegen die Elutionszeit auf, so traten bei guter Abtrennung von Antikörpern und freiem Jodid stets zwei charakteristische, deutlich voneinander abgesetzte Peaks auf: ein erster, größerer, der die radiojodinierte Antikörperfraktion darstellte, und ein zweiter, kleinerer, der durch das freie Jodid verursacht wurde (s. Abb. 1).
In der Regel war die Antikörperfraktion in 2-5 Fraktionen zu je 0,5-0,6 ml Eluat zu finden.

Der Anteil an freier, nicht proteingebundener Radioaktivität in der Fraktion der jodinierten Antikörper wurde dadurch ermittelt, daß die Antikörperproteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt wurden und die Radioaktivität des Überstandes gemessen wurde: Über 95 % der Radioaktivität des markierten Antiserums war mit TCA fällbar, die freie Radioaktivität also mit weniger als 5 % durchaus gering.
Die Antikörperkonzentration des radiojodinierten Antiserums wurde durch mehrere photometrische Messungen (Zeiss Photometer PMQ II) in Quarzglasküvetten bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt ($A^{1\%}_{1cm} = 13,5$).

Die spätere Berechnung der Anzahl von membrangebundenen Antikörpern erforderte ein Maß für die spezifische Radioaktivität des Proteins. Aus diesem Grund wurde im Gamma-counter die Anzahl der radioaktiven Zerfälle ermittelt, die durch 0,02 ml von 1:10 verdünntem Antiserum verursacht wurden.

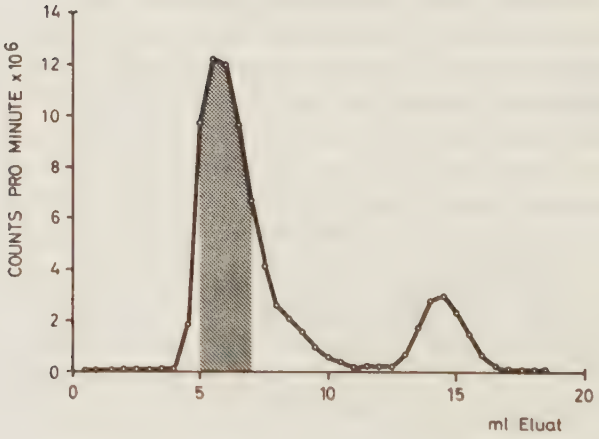
Die Aufbewahrung der radiojodinierten Antikörper erfolgte bei 4^{o} C, nachdem zuvor 5 Volumenprozent bovines Serumalbumin hinzugefügt worden waren. Der Zusatz von Protein zu den radiojodinierten Antikörpern vermag die Freisetzung ('escape') von Jodidionen oder Jod

zu reduzieren oder gar zu verhindern (32).

Der dadurch eingetretenen Verdünnung des Antiserums wurde durch Reduzierung der gemessenen Antikörperkonzentration um 5 % Rechnung getragen.

Abb. 1 Abtrennung des freien Jodids von der Antikörperfraktion nach der Radiojodinierung durch Gelfiltration.

1. Gipfel: Antikörper; die 4 Fraktionen mit hoher Antikörperkonzentration (schraffierte Fläche) wurden für die Inkubation der Zellen verwendet.
2. Gipfel: Freies Jodid.



V. Markierung von Zellen mit radiojodinierten Antikörpern

0,02 ml der Zellpräparation, entsprechend einem Zellgehalt von 0,5 x 10^6 Zellen, wurden 3 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand mit einer Mikroliterpipette entfernt. Auf das Zellsediment wurden 0,02 ml jodiniertes Antiserum gegeben, der Ansatz gut durchgemischt und für 45 Minuten inkubiert. Im Abstand von 10 Minuten wurden die Zellen aufgewirbelt, um ein Sedimentieren zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal in je 2 ml PBS mit einem Zusatz von 20 % BSA gewaschen, um nichtzellgebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde das Zellsediment unter Wechsel des Gefäßes durch einen Serumgradienten zentrifugiert, der aus drei Schichten, nämlich 100 % Rinderalbumin unten, 50 % in der Mitte und 25 % in der oberen Schicht bestand. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Zellsediment aufgewirbelt und konnte nun auf dem Objektträger ausgestrichen oder mit der Zytozentrifuge auf den Objektträger zentrifugiert werden.

VI. Herstellung der Autoradiogramme

Die Autoradiogramme einer Versuchsserie wurden stets vom Ausstreichen der Zellen bis zum Entwickeln des Filmes und dem anschließenden Färben der Präparate vollkommen identisch behandelt und die einzelnen Schritte jeweils gleichzeitig durchgeführt.

1. ^{125}J-Standard

Als ^{125}J-Standard wurden enzymatisch radiojodinierte Humanerythrozyten mit der Zytozentrifuge (Shandon, Großbritannien) auf den Objektträger zentrifugiert.

Hierzu wurden 0,01 ml der 2 %igen Standarderythrozytensuspension mit 0,2 ml PBS verdünnt und bei 800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Überschüssiges PBS wurde von einem Filterpapier aufgesaugt, das sich zwischen Objektträger und Zentrifugeneinsatz befand.

2. Zellausstriche

Die markierten Erythrozyten wurden mit einem Deckgläschen gleichmäßig auf den gereinigten Objektträgern ausgestrichen.

3. Fixation der Zellausstriche in Methanol

Nach dem Lufttrocknen wurden die Präparate 48 Stunden in Methanol fixiert, um eine unspezifische Schwärzung der Filmemulsion als Auswirkung negativer Chemographie zu verhindern (33).

4. Aufbringen der Filmemulsion auf die Objektträger

Nach der Fixation in Methanol wurden die Präparate auf der Rückseite und den Kanten mit 0,5 %iger Gelatinelösung bestrichen, um ein besseres Haften des Filmes zu erreichen.
Das Aufbringen der Kodak AR 10 Stripping-Filme erfolgte nach der von SCHMID 1965 (34) beschriebenen Methode, die Einflüsse der relativen Luftfeuchtigkeit in der Dunkelkammer und Einflüsse von elektrostatischen Effekten vermeidet.
Hierbei wurden die den Stripping-Film tragenden Glasplatten für 6 Minuten in 70 % Äthanol gelegt, um die Filmemulsion gut zu durchfeuchten, was eine gute Schneidbarkeit gewährleistet. Der Film wurde auf einem Schneidebrett in 8 gleichgroße, rechteckige Stücke geschnitten, die etwas größer als die Objekt-

träger waren. Anschließend wurden die Filmplatten 6 Minuten in 100 % Äthanol getrocknet; danach ließen sie sich leicht von der Glasplatte lösen und wurden mit einer Pinzette auf die Oberfläche von destilliertem Wasser von konstanter Temperatur überführt. Nachdem sich die Filme gleichmäßig ausgebreitet hatten, wurden sie innerhalb von 3 Minuten auf die Objektträger aufgezogen.
Die Präparate wurden 90 Minuten im kalten Luftstrom getrocknet und in lichtdichte Kästen, die Blaugel (Merck) als hygroskopisches Mittel enthielten, umgesetzt.
Danach wurden die Autoradiogramme bei ca. -20° C 3 bis 8 Tage lang exponiert.

5. Entwickeln der Filme

Zahl und Größe der Silberkörner auf einem Autoradiogramm können durch die Art des Entwicklers, durch die Dauer des Entwicklungsvorganges und durch die beim Entwickeln herrschende Temperatur beeinflußt werden. Aus diesem Grund wurden alle Autoradiogramme unter standardisierten Bedingungen 6 Minuten bei genau 18° C in Amidol-Entwickler (35) entwickelt.
Die Entwicklerlösung bestand aus:

4,5 g 4-Hydroxy-m-phenylendiammoniumchlorid krist. (Amidol), Merck, Darmstadt
0,8 g Kaliumbromid (Merck)
18 g Natriumsulfit, wasserfrei (Merck)
aqua dest. ad 1000 ml

6. Fixieren

Nach dem Entwickeln wurden die Autoradiogramme ohne Zwischenbad für 20 Minuten bei 18° C in saurem Fixierbad fixiert. Die Fixierlösung bestand aus:

300 g Natriumthiosulfat-5-hydrat krist., reinst (Merck)
1 g Kaliumchrom(III)-sulfat, (Chromalaun) (Merck)
30 g Kaliumdisulfit, (Merck)
aqua dest. ad 1000 ml

7. Färben und Differenzieren

Nach einer Wässerung von 90 Minuten in fließendem Leitungswasser und Abspülen in destilliertem Wasser wurden die Präparate luftgetrocknet. Die anschließende Färbung nach Giemsa erfolgte durch den Film hindurch. Überschüssige Farblösung wurde durch Differenzieren mit einem kalten Äthanol-Phosphatpuffer-Gemisch im Verhältnis 3:7 entfernt.
Filmteile, die den Objektträger überlappt und sich an dessen Rückseite angelegt hatten, wurden mit dem Skalpell abgeschabt.

VII. Photometrische Messung der Silberkörner

1. Meßapparatur

Die Silberkörner über den Zellen wurden mittels der Auflicht-Hellfeld-Photometrie mit einem Mikroskop-Photometer mit variabler Meßblende (MPV 2, Fa. Leitz, Wetzlar) gemessen.
Der mikroskopische Teil dieser Apparatur besteht aus einem Ortholux-Mikroskop mit einer seitlich angeordneten Quecksilberdampflampe (St 75, Philips, Niederlande) als Auflichtbeleuchtung. Zur Betrachtung der Autoradiogramme bei Durchlicht dient eine Niedervoltleuchte, die auf einfache Weise durch Knopfdruck durch einen Klappspiegel ein- und ausblendbar ist. Der photometrische Teil, bestehend aus

einer Photokathode und einem Sekundärelektronenvervielfacher, registriert auf photoelektrischem Weg das von den Silberkörnern remittierte Licht. Die Silberkörner über der Zelle werden durch dasselbe Objektiv beleuchtet, welches auch für die Betrachtung der Zelle und das photometrische Messen der Silberkörner verwendet wird. Das von den Silberkörnern reflektierte Licht gelangt so entweder an das Auge des Betrachters oder es wird in die Ebene der Meßapertur, die vor der Photozelle angeordnet ist, projiziert. Die Meßapertur, eine Irisblende, wird von oben durch eine Niedervoltleuchte beleuchtet, sodaß ihr Bild zusammen mit der Zelle und den darüberliegenden Silberkörnern gesehen werden kann. Das Abbild des Meßfeldes wurde durch Vergrößern oder Verkleinern der Meßapertur vor Beginn einer Serie von Messungen an die Größe der zu messenden Zellen angepaßt, danach aber konstant gehalten. Dabei betrug der zur Messung geeignete Durchmesser des Meßfeldes etwa das zweifache des Zelldurchmessers (THIEL 1975, 36). Ebenfalls konstant gehalten wurde das von der Quecksilberdampflampe über eine Leuchtfeldblende beleuchtete Areal, das Leuchtfeld, welches das Meßfeld ein wenig überlappen soll (Dörmer 1967).
Um Netzschwankungen auszugleichen, sind die Versorgungsgeräte für den Photomultiplier und die Quecksilberdampflampe an einen magnetischen Spannungskonstanthalter angeschlossen.

2. Meßvorgang

Die zu messende Zelle wird in das Meßfeld gebracht und fokussiert. Nachdem das Durchlicht ausgeblendet wurde, gelangt das von den Silberkörnern remittierte Licht durch die Meßapertur zur Photokathode, der ein Photomultiplier angeschlossen ist. Als Äquivalent für die Silberkornzahl wird die relative Menge des remittierten

Lichtes als meßbarer Strom auf einem Galvanometer abgelesen und in Digitalwerte umgeformt.

3. Registrierung der Meßwerte

Eine dazugeschaltete Rechenmaschine (Diehl Combitron S) druckt die Meßwerte einzeln aus und gibt die Anzahl der Meßwerte, sowie Mittelwert und Standardabweichung an. Darüberhinaus können die Meßwerte durch ein Lochstreifenstanzgerät (Kienzle) auf Lochstreifen festgehalten und über elektronische Datenverarbeitung als Histogramme ausgedruckt werden.

4. Eichen des Photometers

Die photoelektrische Registrierung des remittierten Lichts muß während einer Meßperiode konstant gehalten werden, um einzelne Meßwerte vergleichen zu können. Aus diesem Grund wurde das Photometer in Abständen von 15 Minuten mit Hilfe eines Eichobjektivs als Reflexionsstandard und einer Eichblende geeicht. Die Eichblende besteht aus einer Irisblende, deren Stellung nicht verändert wird und die beim Eichvorgang anstelle der Meßblende eingesetzt wird. Das Eichobjektiv befindet sich neben dem Objektiv, das für die Messung der Silberkörner benutzt wird. Es ist von einer Hülse umgeben, die auf der Innenseite einen Reflektor trägt. Hülse und Objektiv sind fest miteinander verbunden, sodaß bei konstantem Lichteinfall eine konstante Lichtmenge reflektiert wird. Durch Veränderung der Hochspannung des Photomultipliers kann der Meßwert des Reflexionsstandards von Zeit zu Zeit dem zu Beginn einer Meßserie ermittelten Ausgangswert angepaßt werden.

5. Auswahl der Zellen

Es wurden nur hinreichend isoliert liegende Zellen gemessen, um Streulicht-Effekte von benachbarten Zellen auszuschließen.

6. 'Background'-Messungen

Die Untergrundhelligkeit wurde auf jedem Präparat im Bereich der ^{125}J-Standardzellen und im Bereich der mit Antikörpern markierten Zellen durch Messungen von 20 unmarkierten Zellen bestimmt. Wo dies nicht möglich war, weil alle Zellen markiert waren, wurde der zellfreie Untergrund gemessen. Dabei erwies sich, daß praktisch kein Unterschied bestand zwischen zellfreiem Untergrund und Remissionswert über unmarkierten Erythrozyten.

VIII. Absolute Quantifizierung von membrangebundenen Antikörpern

Quantitative autoradiographische Bestimmungen radiojodinierter Substanzen auf einzelnen Zellen lassen sich durchführen, wenn die spezifische Aktivität der Substanz ermittelt ist zusammen mit der spezifischen Radioaktivität einer Standardquelle, deren Silberkorndichte vergleichend zur Silberkorndichte der zu untersuchenden Zelle bestimmt wird (THIEL, 1976). Demzufolge läßt sich eine quantitative Bestimmung von jodmarkierten Anti-A-Molekülen, die an einen einzelnen Erythrozyten gebunden wurden, mit der Technik der ^{125}J-Autoradiographie durchführen, wenn folgende Daten bekannt sind:

1) die spezifische Radioaktivität der Anti-A-Moleküle;

2) die Radioaktivität der enzymatisch radiojodinierten Standardzellen (cpm/Standardery);
3) der photometrische Meßwert der Standarderythrozyten (als Mittelwert von 30-50 gemessenen Zellen);
4) der photometrische Meßwert der zu untersuchenden Zellen.

Die spezifische Radioaktivität 1) läßt sich nach der Ermittlung des Proteingehaltes (mg/ml) des Antiserums und der Messung einer Probe mit definiertem Proteingehalt im Gamma-counter als counts pro Minute/mg Protein errechnen. Legt man für das Immunglobulin G ein Molekulargewicht von 160 000 zugrunde, so ergibt sich durch die AVOGADRO'sche Konstante, daß 1 mg IgG $3{,}76 \times 10^{15}$ Moleküle enthält. Damit läßt sich die spezifische Radioaktivität in cpm/Antikörpermolekül ausdrücken.
1) und 2) sind in jedem Experiment Konstanten; so läßt sich die von einer Zelle gebundene Anzahl N von Anti-A-Molekülen direkt aus den photometrischen Meßwerten der Testzelle und der auf demselben Präparat mitexponierten Standarderythrozyten wie folgt berechnen:

$$N = \text{Photometrischer Meßwert der Testerythrozyten} \times \frac{S}{A},$$

$$\text{wobei } S = \frac{\text{Radioaktivität/Standarderythrozyt}}{\text{Photometr. Meßwert/Standarderythrozyt}}$$

$$\text{und } A = \text{Radioaktivität/Anti-A-Molekül} \quad \text{ist.}$$

C. ERGEBNISSE

I. ENTFERNUNG VON NICHT ZELLGEBUNDENER RADIOAKTIVITÄT

Um die Zahl der zur Entfernung nicht zellgebundener Radioaktivität notwendigen Auswaschungen der Zellsuspension nach Inkubation zu ermitteln, wurden A_1-Erythrozyten mit ^{125}J-IgG-Anti-A inkubiert und anschließend achtmal in PBS gewaschen. Nach jeder Waschung wurde die im Ansatz verbliebene Radioaktivität als counts pro Minute im Gamma-counter gemessen.

Abb. 2 Auswirkungen verschieden häufiger Waschungen der Zellsuspension

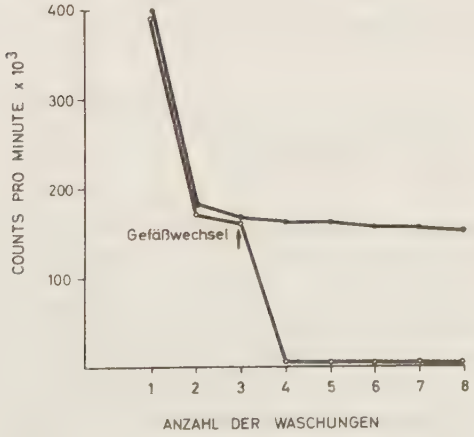


Abb. 2 zeigt, daß die Werte nach der 3. Waschung ein Plateau bildeten, d.h. sich durch weitere Waschungen allein nicht mehr wesentlich verringern ließen. Dabei handelte es sich jedoch nicht ausschließlich um

Radioaktivität, die durch zellgebundene ^{125}J-markierte Antikörper dargestellt wurde. Dies konnte dadurch gezeigt werden, daß zwischen der 3. und 4. Waschung ein Gefäßwechsel vorgenommen wurde, was eine entscheidende Senkung der unspezifischen Radioaktivität im Ansatz bewirkte.
Der im Vergleich zur eingesetzten Proteinmenge geringe zellgebundene Anteil zeigt zum Einen, daß im Bereich eines großen Antikörperüberschusses gearbeitet wurde, zum Anderen, daß ein beträchtlicher Anteil des Antikörperproteins unspezifisch an der Innenwand der Reagiergefäße haften kann.
Diese Fehlerquelle, die sich allerdings bei autoradiographischen Untersuchungen nicht in diesem Maße auswirken kann, da die Zellen auf Objektträgern ausgestrichen und einzeln gemessen werden, muß bei Bindungsanalysen, die in Form von Radioimmunoassays durchgeführt werden, berücksichtigt werden.

II. AUSWIRKUNGEN DER FIXIERUNG VON ERYTHROZYTEN

1. Vergleichende Untersuchung von unfixierten und fixierten Erythrozyten

Ob und inwieweit die Fixierung von Erythrozyten ihre Fähigkeit Antikörper spezifisch zu binden verändert, wurde in einer vergleichenden Untersuchung von frischen unfixierten und glutaraldehydfixierten Erythrozyten ermittelt. Dabei wurde die Glutaraldehydkonzentration der Fixationslösung schrittweise bis zu einer Konzentration von 10 % erhöht.
Nach der Fixation wurden die Erythrozyten jeweils dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit ^{125}J-IgG-Anti-A inkubiert. Die darauffolgenden Auswaschungen mit PBS bzw. BSA erfolgten in der bereits

geschilderten Weise (Kap. V.)

Abb. 3 Effekte der Glutaraldehydfixation auf die Bindung von ^{125}J-IgG-Anti-A an Erythrozyten verschiedener Blutgruppen. Die Erythrozyten waren in Lösungen unterschiedlicher Glutaraldehydkonzentrationen fixiert worden.

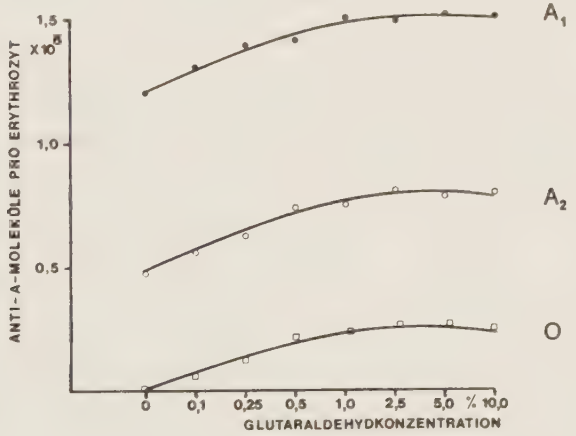


Abb. 3 zeigt, daß die Zahl der membrangebundenen Antikörpermoleküle mit zunehmender Glutaraldehydkonzentration bis zu einer Konzentration von etwa 2,5 % anstieg. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration auf 10 % war ein Zunehmen des gebundenen Proteins nicht mehr zu beobachten.
Daß es sich hierbei um unspezifische Effekte, also nicht um eine Veränderung der zu untersuchenden Membranantigene handelte, zeigte die Tatsache, daß bei Inkubation mit Anti-A auch Erythrozyten der Blutgruppe O mit steigender Glutaraldehydkonzentration mehr Protein banden, und zwar in demselben Ausmaß. Der prozentuale Anteil dieser unspezifischen Bindung stieg mit der Glutaraldehydkonzentration des Fixationsmediums.

Die Höhe dieser unspezifischen Bindung ist in Tab. 2 absolut (O-Erythrozyten) und prozentual angegeben. Bei der Angabe der unspezifischen Bindung in Prozent wurden jeweils die Werte der A_1-Erythrozyten zugrundegelegt.

Tab. 2 Ausmaß der unspezifischen Bindung von Antikörperprotein in Abhängigkeit von der Glutaraldehydkonzentration im Fixationsmedium.

GLUTARALDEHYD-KONZENTRATION (%)	ANTI-A-MOLEKÜLE PRO ERYTHROZYT ($x10^6$)			UNSPEZ. BINDUNG (%)
	A_1	A_2	O	
0	1,20	0,48	0	0
0,1	1,30	0,56	0,06	4,6
0,25	1,39	0,63	0,12	8,6
0,5	1,42	0,73	0,22	15,5
1,0	1,50	0,75	0,24	15,9
2,5	1,49	0,81	0,26	17,4
5,0	1,51	0,78	0,26	17,2
10,0	1,51	0,79	0,25	16,5

2. Verminderung der unspezifischen Bindung von Antikörperprotein

Tab. 3 zeigt, daß durch einmaliges Waschen mit geeigneten Medien die durch die Glutaraldehydfixierung verursachte unspezifische Bindung um etwa die Hälfte vermindert werden konnte. Dieser Waschvorgang erfolgte nach der Fixierung und vor der Inkubation mit den markierten Antiseren. Dabei zeigte sich, daß weder eine Waschung mit physiologischer NaCl-Lösung noch mit einer Lösung von Lysin·HCl eine Verminderung der unspezifischen Bindung bewirken konnte. Im Gegensatz dazu konnte durch Waschungen mit Lysin- bzw. BSA-Lösungen die unspezifische Bindung deutlich geringer gehalten werden. Besonders das unterschiedliche Verhalten von Lysin·HCl und Lysin legt die Erklärung nahe, daß offensichtlich freie NH_2-Gruppen im Waschmedium erforderlich sind, um bei der Fixation entstandene Aldehydgruppen im Sinne der Bildung einer Schiff'schen Base abzudecken. Geschieht dies nicht, werden diese Aldehydgruppen, zusätzlich zur spezifischen Bindung durch die Antigen-Antikörper-Reaktion, durch Antikörperprotein besetzt, was einer Zunahme der unspezifischen Bindung gleichkommt.

Durch weitere Waschungen nach der Fixierung mit PBS allein, konnte die unspezifische Bindung nicht vermindert werden. Die Tatsache, daß nach 2,4,6 und 8 PBS-Waschungen nach Fixation die Zahl der gebundenen Antikörpermoleküle jeweils gleich hoch war, zeigt, daß bereits durch zwei Waschungen der fixierten Erythrozyten überschüssiges Glutaraldehyd entfernt wurde, bzw. daß die entstandenen Aldehydgruppen durch PBS-Waschungen nicht verringert werden konnten.

Tab. 3 Verminderung der unspezifischen Bindung markierter Proteine durch Vorwaschungen mit Proteinlösungen nach Glutaraldehydfixierung

VORWASCHUNG MIT	phys. NaCl	LYSIN·HCl	LYSIN	BSA[1]
Unfixiert	0	0	0	0
0,1 %[2]	78 000[3]	75 000	66 000	67 000
0,5 %	135 000	130 000	72 000	71 000
1,0 %	180 000	162 000	78 000	76 000

1) bovines Serumalbumin, 5 %ig

2) Glutaraldehydkonzentration

3) Anti-A-Moleküle/0-Erythrozyt

Allerdings gelang es auch durch Vorwaschungen mit Proteinlösungen nicht, die unspezifische Bindung von Antikörperprotein an fixierte Erythrozyten vollständig zu unterbinden. Deshalb war es erforderlich, in jedem Versuch, in dem fixierte Erythrozyten verwendet wurden, auch O- oder B-Erythrozyten als Kontrolle mit Anti-A-^{125}J zu inkubieren.

3. Haltbarkeit der fixierten Erythrozyten

Eine Veränderung der Membraneigenschaften einmal fixierter Erythrozyten konnte im Untersuchungszeitraum nicht festgestellt werden. Bei Untersuchungen bis zu 16 Monaten nach Fixation der Erythrozyten wurde in allen 5 untersuchten Fällen etwa die gleiche Anzahl antigener Bindungsstellen auf der Zellmembran ermittelt. Die höchste Differenz wurde mit etwa 4 % im Falle der A_2B-Normalperson nach 16 Monaten gefunden (Tab. 4).
Dies zeigt deutlich, daß die einmal fixierten Membranantigene von Erythrozyten über den Zeitraum von mindestens 16 Monaten keinen Veränderungen unterworfen sind.
Weiter kann man daraus ersehen, welch hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit der Technik der Quantitativen photometrischen Immunautoradiographie erzielt werden kann.
Da in 4 von den 5 angeführten Beispielen bei der Zweituntersuchung andere heterologe Immunglobuline verwendet wurden als in der Erstuntersuchung, kann darüberhinaus festgestellt werden, daß man bei dieser Technik auch mit verschiedenen Antiseren vergleichbare Resultate erhält.

Tab. 4 Untersuchung der antigenen Bindungsstellen fixierter Erythrozyten nach verschieden larger Aufbewahrung nach Fixierung

SPENDER	ZEITPUNKT DER MESSUNG	ANTI-A-MOLEKÜLE PRO ERYTHROZYT
A_1-Neugeborenes	unmittelbar nach Fixierung	532 000
	9 Monate später	520 000
A_1-Normalperson	unmittelbar nach Fixierung	1 400 000
	16 Monate später	1 430 000
A_2-Normalperson	unmittelbar nach Fixierung	700 000
	16 Monate später	680 000
A_2B-Normalperson	unmittelbar nach Fixierung	225 000
	16 Monate später	234 000
A_2-Leukämie	unmittelbar nach Fixierung	135 000
	6 Monate später	135 000
	13 Monate später	134 000

Um Keim- oder Pilzwachstum zu verhindern, wurde neben der Verwendung von sterilen Gefäßen zusätzlich Merthiolat als Hemmstoff verwendet und die Proben bei 4° C aufbewahrt.

III. BESTIMMUNG DES SÄTTIGUNGSBEREICHES

Um eine Aussage über die absolute Anzahl von Membranantigenen machen zu können, ist es erforderlich, der Zelle die spezifischen Antikörper in einer Konzentration anzubieten, die gewährleistet, daß alle antigenen Bindungsstellen abgesättigt werden können. Diese Antikörperkonzentration kann durch Titration ermittelt werden, d.h. es wird die Anzahl der gebundenen Antikörper als Funktion der angebotenen Antikörperkonzentration gemessen.

Abb. 4 Sättigungstitration (direkte Markierung)

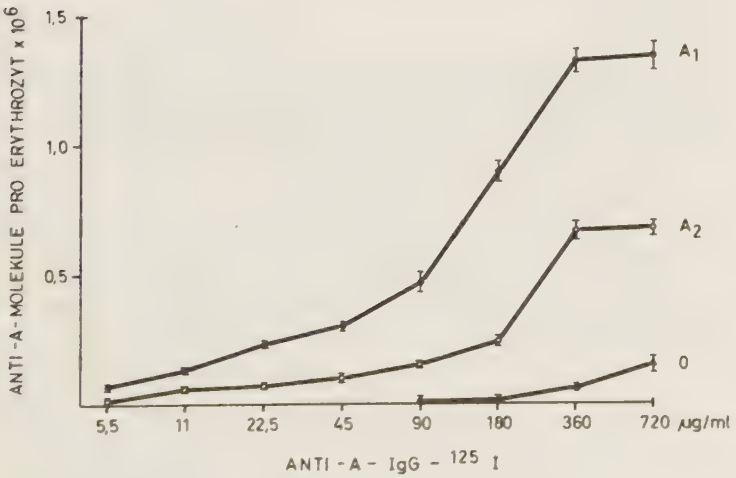
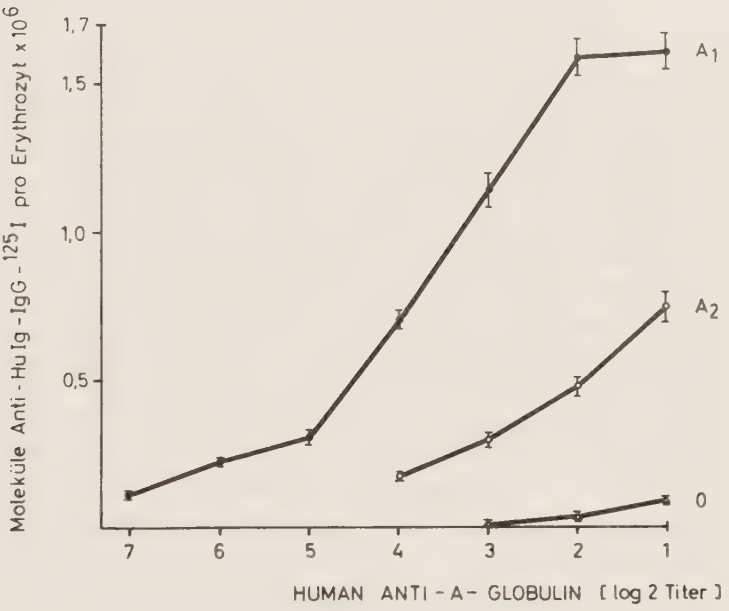


Abb. 4 zeigt, daß die Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörpermoleküle mit steigender Antikörperkonzentration bis zu einem Punkt anstieg, ab welchem keine weitere Bindung beobachtet werden konnte.
Das Erreichen dieses Plateaus bedeutete, daß alle antigenen Bindungsstellen ab einer bestimmten Antikörperkonzentration gesättigt waren; für das Kaninchen-Anti-A in Abb. 4, welches einen Agglutinationstiter von 1:512 gegen A_1-Erythrozyten besaß, lag dieser Bereich bei 0,36 - 0,72 mg/ml.

Dies würde einer Serumverdünnung von etwa 1:25 entsprechen, da zu Anfang eine Konzentration von 10 mg/ml IgG vorlag. Demzufolge ist eine etwa 20-fach höhere Antikörperkonzentration zur Abdeckung aller Membranantigene erforderlich verglichen zu derjenigen, die zur Agglutination der Erythrozyten ausreicht. Während im agglutinierenden Bereich der Antikörperkonzentration lediglich 230 000 Anti-A-Moleküle pro A_1-Erythrozyt gebunden wurden, wurde im Sättigungsbereich bei einer 20-fach höheren Antikörperkonzentration mit 1 300 000 ein etwa sechsmal höherer Wert ermittelt.

Ein weiteres heterologes Anti-A-Serum (Agglutinationstiter 1:256) sättigte ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml alle antigenen Bindungsstellen ab.

Abb. 5 Sättigungstitration (indirekte Markierung)



Der Sättigungstitration in Abb. 5 lag eine andere Versuchsanordnung zugrunde: In einer indirekten Markierungstechnik waren Humanerythrozyten mit verschiedenen Verdünnungen eines humanen Anti-A-Immunglobulins vorinkubiert worden. Danach erfolgte eine Inkubation mit ^{125}J-markiertem Kaninchenimmunglobulin-Anti-Humanglobulin. Bei Verdünnungen des Human-Anti-A-IgG von 1:4 und weniger konnten bei A_1-Erythrozyten alle antigenen Bindungsstellen abgedeckt werden, während bei A_2-Erythrozyten in diesem Bereich noch ein Anstieg zu verzeichnen war.

IV. VERHÄLTNIS DER ANTI-A-ANTIKÖRPERBINDUNG VON A_1-ERYTHROZYTEN ZU DER VON A_2-ERYTHROZYTEN

In den folgenden Tabellen 5 und 6 wurden die Bindungswerte heterologer und homologer Antikörper zu einzelnen Erythrozyten von A_1- und A_2-Spendern nochmals in Abhängigkeit zur Antikörperkonzentration aufgeführt. Zusätzlich hierzu wurde das Verhältnis der Bindung auf A_1-Erythrozyten verglichen zu der Bindung auf A_2-Erythrozyten angegeben. Es zeigte sich, daß das Verhältnis der errechneten antigenen Bindungsstellen von A_1- und A_2-Erythrozyten bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen nicht konstant blieb: in den Bereichen niedriger Antikörperkonzentrationen war das Verhältnis A_2:A_1 wie 1:3 bzw. 1:4, während bei beiden Antiseren im Sättigungsbereich ein Verhältnis von etwa 1:2 gefunden wurde.

Demzufolge erscheint es von großer Wichtigkeit, mit ausreichend hohen Antikörperkonzentrationen zu arbeiten, wenn man die Antigenausprägung auf verschiedenen Zellen vergleichend untersuchen möchte. Aus diesem Grund wurden bei den weiteren Untersuchungen stets sättigende Antikörperkonzentrationen angewandt.

Tab. 5 Anzahl antigener Bindungsstellen auf A_1- und A_2-Erythrozyten bei unterschiedlicher Antikörperkonzentration. Direkte Markierung.

Proteinkonzentration (µg/ml)		45	90	180	360	720
	A_1	300 000	470 000	900 000	1 330 000	1 350 000
	A_2	100 000	150 000	240 000	670 000	680 000
Verhältnis	$A_2 : A_1$	1 : 3,00	1 : 3,13	1 : 3,75	1 : 1,98	1 : 1,98

Tab. 6 Indirekte Markierung.

Anti-A Titer	1 : 16	1 : 8	1 : 4	1 : 2
A_1	700 000[§]	1 150 000	1 600 000	1 620 000
A_2	170 000	300 000	480 000	750 000
$A_2 : A_1$	1 : 4.1	1 : 3.8	1 : 3.3	1 : 2.1

[§] Durchschnittliche Anzahl von ^{125}J markierten Antikörpern gegen Humanglobulin die nach Vorinkubation mit isologem immun-Anti-A pro Erythrozyt gebunden wurde

V. QUANTITATIVE AUSPRÄGUNG DES BLUTGRUPPENANTIGENS A AUF ERYTHROZYTEN VERSCHIEDENER SPENDER

Nach der Erarbeitung verbindlicher experimenteller Vorkehrungen (siehe Kap. II-IV) wurde die Bindung von Anti-A-Antikörpern auf einzelnen Erythrozyten mit Hilfe der quantitativen photometrischen Immunautoradiographie bei insgesamt 106 Personen gemessen.

Die in den Tabellen 7 bis 23 aufgeführten Werte geben die Anzahl von Anti-A-Molekülen an, die ein Erythrozyt nach direkter Markierung mit Anti-A-^{125}J durchschnittlich gebunden hatte. Sämtliche Werte sind um den Betrag der unspezifischen Bindung (siehe II.1. und 2.) korrigiert.

1. NORMALPERSONEN

Bei den erwachsenen Normalpersonen handelte es sich ausschließlich um gesunde Spender. Blutproben von Kindern, die sich in ambulanter oder stationärer Behandlung befanden, wurden nur verwendet, wenn es sich bei der Erkrankung nicht um eine solche des Blutes bzw. der blutbildenden Organe handelte.

a.) A_1-ERYTHROZYTEN

Insgesamt wurden die Erythrozyten von 44 Spendern der Blutgruppe A_1 untersucht.
Darunter befanden sich 9 Erwachsene im Alter zwischen 25 und 95 Jahren.
Die Anzahl der pro Erythrozyt gebundenen Anti-A-Moleküle ist als Durchschnittswert von mindestens 200 Erythrozyten pro Spender in Tab. 7 angegeben.

Tab. 7 Anzahl der gebundenen Anti-A-Moleküle auf Erythrozyten von erwachsenen Spendern der Blutgruppe A_1.

SPENDER	ALTER	ANTI-A-MOLEKÜLE/A_1-ERY
Fä.	25 Jahre	1 390 000
Re.	28 Jahre	1 250 000
Mo.	30 Jahre	1 350 000
Th.	33 Jahre	1 400 000
Dr.	35 Jahre	1 120 000
Kr.	35 Jahre	1 350 000
En.	45 Jahre	1 300 000
v.T.	50 Jahre	1 700 000
Fe.	95 Jahre	1 170 000

Weiterhin wurden die Erythrozyten von 27 Kindern im Alter von 9 Tagen bis zu 15 Jahren untersucht. Mit nur 440 000 Anti-A-Molekülen/Erythrozyt wies der jüngste Spender, ein 9 Tage alter Säugling, auch die niedrigste Antigendichte dieser Gruppe auf. Auffallend niedrig war auch die A-Antigendichte der Erythrozyten eines 22 Tage alten Säuglings, bei dem es sich um eine Frühgeburt in der 33. Schwangerschaftswoche handelte. Die höchste Antigendichte dieser Gruppe von Kindern wurde bei einem 11 Monate alten Jungen gefunden und lag mit 1 900 000 noch etwas höher als der Höchstwert in der Gruppe der Erwachsenen mit 1 700 000 Anti-A-Molekülen/Erythrozyt.

Die ermittelten Antigendichten/Erythrozyt der 27 Kinder sind in Tab. 8 nach steigendem Lebensalter zusammengestellt.

Tab. 8 Antigendichten auf Erytrhrozyten von 27 Kindern der Blutgruppe A_1 im Alter von 9 Tagen bis zu 15 Jahren.

SPENDER	ALTER	ANTI-A-MOLEKÜLE/A_1-ERY
Kind	9 Tage	440 000
Kind	12 Tage	610 000
Kind	19 Tage	780 000
Kind[1)]	22 Tage	450 000
Kind	26 Tage	640 000
Kind	36 Tage	650 000
Kind	60 Tage	1 180 000
Schu.	3 Monate	1 240 000
Ga.	4 Monate	1 510 000
Sa.	4 Monate	1 400 000
Ad.	4 Monate	1 210 000
Le.	5 Monate	1 440 000
Ril.	6 Monate	1 430 000
Al.	6 Monate	1 030 000
Er.	7 Monate	1 780 000
Ca.	9 Monate	1 340 000
Th.	11 Monate	1 900 000
Hä.	12 Monate	1 300 000
Ko.	13 Monate	1 040 000
Ba.	15 Monate	1 060 000
Schl.	18 Monate	1 670 000
Me.	3 Jahre	1 430 000
Se.	4 Jahre	1 350 000
v.B.	4 Jahre	1 470 000
Yi.	6 Jahre	1 190 000
Ric.	8 Jahre	1 470 000
Zi.	15 Jahre	1 600 000

1) Frühgeburt in der 33. Schwangerschaftswoche

Blutproben von acht Neugeborenen der Blutgruppe A_1 waren freundlicherweise von der II. Frauenklinik der Universität München zur Verfügung gestellt worden und wurden ebenfalls auf die Ausprägung des Antigens A untersucht. Hierbei handelte es sich um unmittelbar post partum aus der Nabelschnur entnommenes Blut; die Erythrozyten waren jeweils innerhalb der nächsten 12 Stunden mit Glutaraldehyd fixiert worden.

Über die Höhe der Bindung von Anti-A-Molekülen an diese Nabelschnurerythrozyten gibt Tab. 9 Auskunft.

Tab. 9 Anzahl der Anti-A-Moleküle, die an Erythrozyten von 8 verschiedenen Neugeborenen der Blutgruppe A_1 gebunden wurden.

Neugeborene	1	210 000
	2	240 000
	3	340 000
	4	340 000
	5	380 000
	6	410 000
	7	460 000
	8	520 000

b.) ANTIGENAUSPRÄGUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER DES SPENDERS

Betrachtet man die Antigendichten aller 44 A_1-Spender (Tab. 7 bis 9), so fällt auf, daß die höchste Antigendichte mit 1 900 000 fast das Zehnfache des niedrigsten Wertes beträgt, der mit 210 000 Anti-A-Molekülen/Erythrozyt auf den Erythrozyten eines Neugeborenen gefunden wurde.
Das jüngste Kind, dessen Erythrozyten mehr als 1 000 000 Anti-A-Moleküle gebunden hatten, war zwei Monate alt. Ab einem Alter von zwei Monaten wurde bei den verbleibenden 29 Spendern kein Wert mehr unter 1 000 000 gefunden, während die Erythrozyten der jüngeren Säuglinge Antigendichten aufwiesen, wie sie bei Neugeborenen in ähnlicher Weise ausgeprägt waren.

Offensichtlich werden die Unterschiede der Antigenausprägung in Abhängigkeit vom Lebensalter, wenn man sämtliche untersuchten A_1-Spender in vier Gruppen einteilt (Tab. 10).

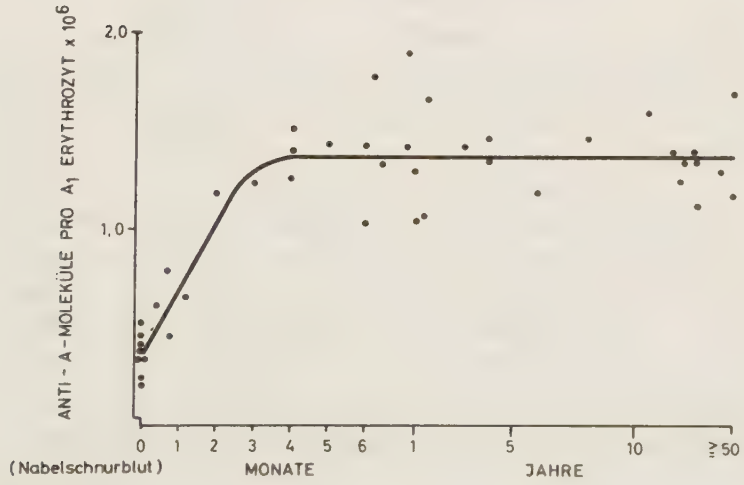
Tab. 10 Antigendichten in Abhängigkeit vom Alter der Spender. Zusätzlich zum Mittelwert der vier verschiedenen Altersgruppen ist jeweils auch die Standardabweichung angegeben.

ALTERSGRUPPE	ANZAHL DER SPENDER	ANTI-A-MOLEKÜLE/A_1-ERY
Neugeborene	8	362 000 ± 104 000
9 bis 60 Tg.	7	678 000 ± 250 000
3 Mo. bis 15 J.	20	1 393 000 ± 233 000
25 J. bis 95 J.	9	1 336 000 ± 166 000

Bereits in der Altersgruppe 9 bis 60 Tage hat sich die Antigendichte seit der Geburt fast verdoppelt. Dieses steile Ansteigen der Antigendichte war im Alter von ca. 3 Monaten beendet. Ab diesem Zeitpunkt war bereits die Antigenausprägung erreicht, die auch bei Erythrozyten von Erwachsenen gefunden wurde. Unterschiede der Antigenausprägung bei Kindern von 3 Monaten bis 15 Jahren und der von Erwachsenen waren mit 1 393 000 bzw. 1 336 000 äußerst gering.

Eine zusammenfassende graphische Darstellung der durchschnittlich pro Erythrozyt gebundenen Anti-A-Moleküle in Abhängigkeit vom Alter der Spender gibt Abb. 6. Die eingezeichnete Kurve verdeutlicht den Anstieg der Antigendichte innerhalb der ersten 3 Lebensmonate.

Abb. 6 A-Antigendichten bei unterschiedlichem Lebensalter von 44 A_1-Spendern.



c.) A_1B-ERYTHROZYTEN

Insgesamt wurden die Erythrozyten von 7 Spendern der Blutgruppe A_1B untersucht. Darunter befanden sich 2 Neugeborene.
Wie bei der Blutgruppe A_1 waren auch hier die Antigendichten von Erythrozyten der beiden Neugeborenen deutlich geringer als die der Erwachsenen. Die Anzahl der Anti-A-Moleküle/Erythrozyt der 2 bzw. 4 Monate alten Kinder lag mit 900 000 bzw. 1 100 000 auch hier bereits in dem Bereich, in dem sich die Werte der erwachsenen Spender befanden.

Tab. 11 Antigen-A-Ausprägung auf Erythrozyten von 7 Personen der Blutgruppe A_1B.

SPENDER	ALTER	ANTI-A-MOLEKÜLE/A_1B-ERY
Neugeborene 1		304 000
2		287 000
Cz.	2 Monate	900 000
Sa.	4 Monate	1 100 000
Ku.	12 Monate	850 000
Ko.	3 Jahre	940 000
Tr.	55 Jahre	900 000

Mittelwert und Standardabweichung für Neugeborene bzw. für die Spender im Alter von 2 Monaten bis 55 Jahren:

Neugeborene	295 500 ± 14 000
2 Mo. bis 55 J.	938 000 ± 96 000

d.) A_2-ERYTHROZYTEN

Ebenfalls 7 Spender, darunter 1 Neugeborenes, wurden innerhalb der Blutgruppe A_2 auf die Ausprägung des Antigens A untersucht.
Die Erythrozyten des Neugeborenen vermochten hier lediglich die Hälfte bis ein Drittel der Zahl von Antikörpermolekülen zu binden, welche die Erythrozyten von Kindern und Erwachsenen gebunden hatten.
In dieser Gruppe der A_2-Personen wurde mit 760 000 Anti-A-Molekülen/Erythrozyt der Höchstwert bei einem 74-jährigen gefunden, fast dieselbe Antigendichte war allerdings auch bei einem erst 2 Jahre alten Spender ermittelt worden.
Der angegebene Mittelwert von 638 000 Anti-A-Molekülen wurde aus den Werten von 6 Spendern im Alter zwischen 9 Monaten und 74 Jahren errechnet.

Tab. 12 Antigen-A-Ausprägung auf Erythrozyten von 7 Personen der Blutgruppe A_2.

SPENDER	ALTER	ANTI-A-MOLEKÜLE/A_2-ERY
Neugeborenes		240 000
Pi.	9 Monate	460 000
Wa.	2 Jahre	750 000
Me.	15 Jahre	660 000
Ki.	27 Jahre	700 000
Ru.	50 Jahre	500 000
Es.	74 Jahre	760 000
Mittelwert und Standardabweichung: 638 000 $\pm$ 128 000		

e.) A_2B-ERYTHROZYTEN

Es wurden die Erythrozyten von 2 Erwachsenen und einem Neugeborenen der Blutgruppe A_2B untersucht.

Mit nur 95 000 Anti-A-Molekülen/Erythrozyt eines Neugeborenen wurde hier die absolut niedrigste Antigendichte aller 61 Normalpersonen gefunden.

Bei der Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung blieb auch hier die Antigendichte des Neugeborenen unberücksichtigt.

Tab. 13 Antigen-A-Ausprägung auf Erythrozyten von 3 Spendern der Blutgruppe A_2B.

SPENDER	ALTER	ANTI-A-MOLEKÜLE/A_2B-ERY
Neugeborenes		95 000
Ka.	32 Jahre	225 000
Tr.	38 Jahre	234 000
Mittelwert und Standardabweichung: 229 500 $\pm$10 000		

f.) VARIATIONSBREITE DER ANTIGENDICHTE INNERHALB EINER ZELLPOPULATION

Bei 15 verschiedenen Spendern der Phänotypen A_1, A_1B, A_2 und A_2B wurde jeweils die innerhalb einer Zellpopulation von Erythrozyt zu Erythrozyt unterschiedliche Antigendichte untersucht. Einen Überblick über die Variationsbreite der Antigendichten in der Erythrozytenpopulation dieser Spender gibt Tab. 14.

Tab. 14 Variationsbreite von Antigendichten innerhalb von einzelnen Zellpopulationen.
Es sind hier die absoluten Zahlen von Anti-A-Molekülen angegeben, die jeweils der am schwächsten (min.) bzw. der am stärksten (max.) markierte Erythrozyt eines Spenderblutes aufwies.

PHÄNOTYP	ALTER	ANTI-A-MOLEKÜLE/ERYTHROZYT min.	max.
A_1	Neugeb.	0	1 200 000
A_1	12 Tg.	65 000	1 740 000
A_1	19 Tg.	0	1 310 000
A_1	22 Tg.[1)]	0	1 200 000
A_1	36 Tg.	310 000	1 320 000
A_1	60 Tg.	710 000	2 110 000
A_1	4 Mo.	300 000	1 610 000
A_1	4 J.	580 000	2 960 000
A_1	30 J.	790 000	2 750 000
A_1B	12 Mo.	420 000	1 670 000
A_2	9 Mo.	57 000	1 450 000
A_2	15 J.	265 000	1 620 000
A_2	50 J.	0	1 040 000
A_2	74 J.	290 000	1 410 000
A_2B	32 J.	0	1 070 000

1) Frühgeburt in der 33. Schwangerschaftswoche

Zum Teil ist auf minimal markierten Erythrozyten das Antigen A nicht nachweisbar, so bei je einem Spender der Blutgruppe A_2 und A_2B, aber auch auf Erythrozyten sehr junger Kinder mit der Blutgruppe A_1.
Die am stärksten markierten Erythrozyten fanden sich mit 2 960 000 gebundenen Anti-A-Molekülen bei einem vierjährigen Spender.

Wie häufig Erythrozyten mit bestimmten Antigendichten in der Zellpopulation eines Spenders vorkommen, zeigen die Histogramme in Abb. 7.

Tab. 14 und Abb. 7 machen deutlich, daß eine Population von Erythrozyten hinsichtlich ihrer Antigendichte sehr heterogen ist und sich in weiten Grenzen um den Mittelwert gruppiert.

Um festzustellen, in welchem Ausmaß experimentelle und meßtechnische Faktoren zu dieser Variationsbreite beitrugen, wurde die Schwankungsbreite der Silberkorndichten über 300 enzymatisch radiojodinierten Humanerythrozyten (siehe Kap. III.3.) gemessen. Die Silberkorndichten dieser Zellen lagen in einer Normalverteilung eng um den Mittelwert gruppiert, wie in Abb. 8 deutlich zu sehen ist.
Ein Vergleich mit dem viel breiter gestreuten Verteilungsmuster der Silberkorndichten von Erythrozyten, die immunologisch mit ^{125}J-Anti-A markiert worden waren, zeigt, daß die Variationsbreite der Antigendichten tatsächlich überwiegend immunologischer Art ist.

Abb. 7 Histogramme der Antigendichten verschiedener Spender.
Es wurden die Antigendichten von jeweils 500 Erythrozyten gemessen.

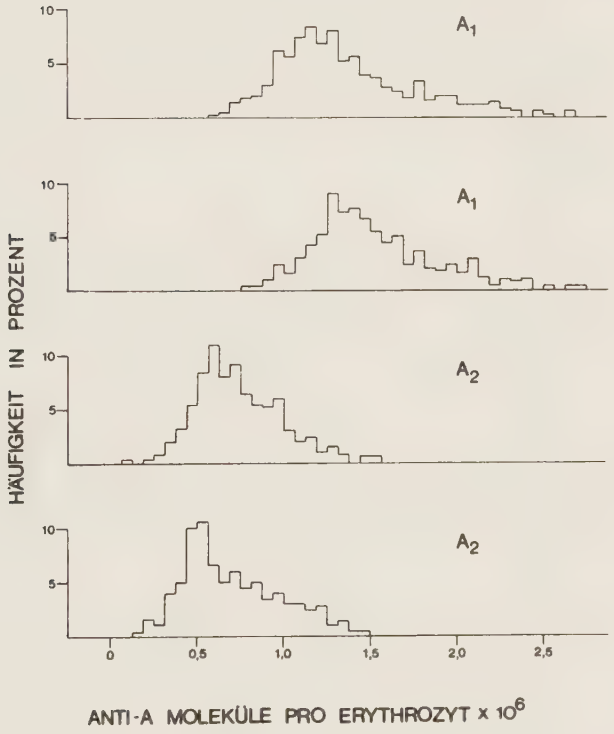
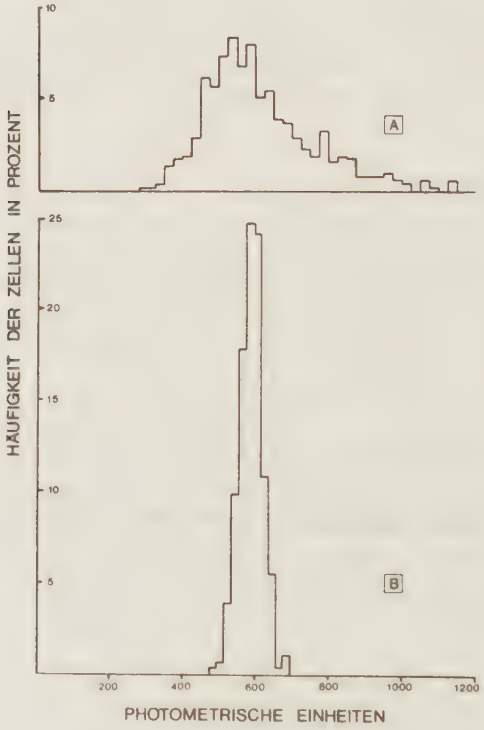


Abb. 8 Vergleich der Silberkorndichten über immunologisch und enzymatisch ^{125}J-markierten Erythrozyten.

Auf der Abszisse sind die photometrischen Einheiten des durch die Silberkörner remittierten Lichtes als Ausdruck der Silberkorndichte angegeben.

A = Histogramm der Silberkorndichten immunologisch markierter Erythrozyten

B = Histogramm der Silberkorndichten enzymatisch markierter Erythrozyten

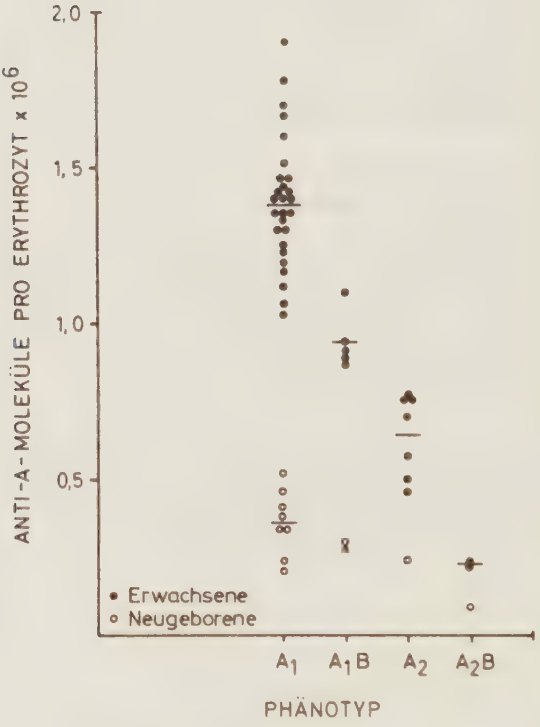


g.) VARIATIONSBREITE DER ANTIGENAUSPRÄGUNG INNERHALB DES SPENDERKOLLEKTIVS EINES PHÄNOTYPS.

Die Ausprägung des Antigens A variierte nicht nur innerhalb der Zellpopulation eines Spenders. Bei der Betrachtung der gemittelten Höchst- bzw. Tiefstwerte von Antigendichten in den Gruppen gleichen Phänotyps waren ebenfalls große Unterschiede festzustellen.
So war der Höchstwert in der Gruppe der A_1-Spender mit 1 900 000 fast doppelt so hoch wie der niedrigste Wert mit nur 1 030 000 Anti-A-Molekülen/Ery. Die höchste Antigendichte in der Gruppe der A_1-Neugeborenen betrug mit 520 000 Anti-A-Molekülen/Erythrozyt mehr als das Zweifache des niedrigsten Wertes, der 210 000 betrug.

Wie in Abb. 9 deutlich zu sehen ist, gruppieren sich die gemittelten Antigendichten - wie innerhalb einer Zellpopulation - auch innerhalb eines Spenderkollektivs in weiten Grenzen um den Mittelwert.

Abb. 9 Zusammenfassende Darstellung der Antigendichten von Neugeborenen und Spendern ab 3 Monaten aller vier untersuchten Phänotypen.



h.) VERGLEICH DER A-ANTIGENDICHTEN VON ERWACHSENEN UND NEUGEBORENEN

Bei allen 4 untersuchten Phänotypen war aufgefallen, daß die aus dem Nabelschnurblut gewonnenen Erythrozyten von Neugeborenen deutlich weniger antigene Bindungsstellen für das Antigen A aufwiesen, als die erwachsener Spender bzw. von Kindern über 3 Monaten.

Das Verhältnis der Antigenausprägung von Neugeborenenerythrozyten zu der von Erwachsenenerythrozyten war jedoch bei den verschiedenen Phänotypen nicht gleich.

Mit annähernd 1 400 000 betrug der Mittelwert der A_1-Erwachsenen fast das Vierfache des Mittelwertes, der für die Neugeborenen ermittelt wurde. In der Gruppe der A_1B-Spender fand sich ein Verhältnis von Erwachsenen zu Neugeborenen wie 3:1, in der Gruppe der A_2- bzw. der A_2B-Spender war dieses Verhältnis mit etwa 2,5:1 noch enger, wie die graphische Darstellung in Abb. 10 zeigt.

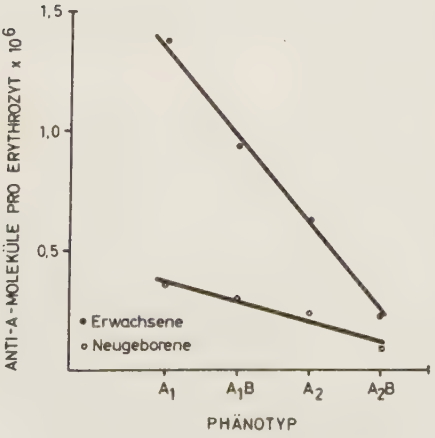


Abb. 10
Mittelwerte der A-Antigendichten von Erwachsenen bzw. Kindern über 3 Monaten im Vergleich zu den Mittelwerten von Neugeborenen.

i.) INDIREKTE MARKIERUNG VON ERYTHROZYTEN

Erythrozyten von je zwei weiteren erwachsenen Normalpersonen der Blutgruppen A_1 und A_2 wurden durch indirekte Markierung untersucht.

Dabei waren die Erythrozyten nach Vorinkubation mit Human-Anti-A-IgG mit ^{125}J-markiertem Kaninchen-Anti-Human-IgG inkubiert worden. Die Anzahl der gebundenen Moleküle des Anti-Human-IgG ist in Tab. 15 angegeben. Sie stimmt mit den Werten, wie sie durch die direkte Markierung ermittelt wurden, gut überein (vgl. Tab.11 und Tab. 12).

Tab. 15 Indirekte Markierung der Erythrozyten von 4 Spendern nach Inkubation mit homologem Anti-A-Globulin. Es sind die Mittelwerte der Anzahl gebundener Antikörpermoleküle von jeweils 200 Erythrozyten angegeben.

PHÄNOTYP	MOLEKÜLE ANTI-HUMAN-IgG/ERY
A_1	1 620 000
A_1	1 600 000
A_2	750 000
A_2	580 000

Demzufolge liegt es nahe, ein Bindungsverhältnis von 1:1 anzunehmen für die Reaktion des indirekten Anti-Immunglobulin-Antikörpers mit dem Anti-A-Immunglobulin, wenn man davon ausgeht, daß von dem homologen Anti-A Serum die gleiche Anzahl antigener Determinanten erkannt wird wie von dem heterologen Anti-A Serum.

2. PATIENTEN MIT ERKRANKUNGEN DES BLUTES UND/ODER DER BLUTBILDENDEN ORGANE

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen des Antigens A auf Erythrozyten von 45 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des Blutes bzw. der blutbildenden Organe sind in den Tabellen 16 bis 21 dargestellt.
Die Diagnosen wurden jeweils durch die behandelnden Kliniken der Universität München und durch Laboruntersuchungen im Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, gestellt.

a.) AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE (ALL)

Es wurden 20 Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie im Alter zwischen 2 und 15 Jahren untersucht. Darunter besaßen 14 Patienten die Blutgruppe A_1, vier die Blutgruppe A_2 und zwei Patienten die Blutgruppe A_1B.
Die A-Antigendichten der Erythrozyten dieser Patienten sind in Tab. 16 nach abnehmender Dichte angegeben.
Der Bereich zwischen Höchst- und Tiefstwert umfaßt bei allen 3 Phänotypen eine größere Breite als dies bei den Normalpersonen der Fall war.
Bei den A_1- und A_2-ALL-Patienten besaßen die Erythrozyten der Patienten mit den wenigsten antigenen Bindungsstellen lediglich ein Drittel der Patienten mit den höchsten Antigendichten desselben Phänotyps. Von den 14 ALL-Patienten mit Blutgruppe A_1 wiesen acht eine Antigendichte auf, wie sie bei Normalpersonen gefunden wurde, sechs dagegen deutlich verminderte Antigendichten.

Tab. 16 Quantitative Ausprägung des Antigens A auf Erythrozyten von Patienten mit ALL.

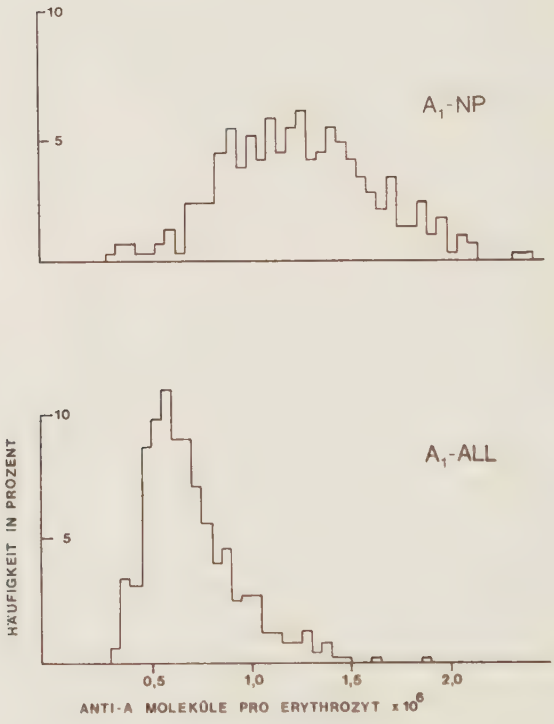
PHÄNOTYP	PATIENT	ALTER	DIAGNOSE	ANTI-A-MOLEKÜLE PRO ERYTHROZYT
A_1	Ru.	10 J.	ALL	1 450 000
A_1	Br.	14 J.	ALL	1 360 000
A_1	Ba.	10 J.	ALL	1 320 000
A_1	x) Ha.	2 J.	ALL	1 300 000
A_1	Bl.	13 J.	ALL	1 270 000
A_1	Me.	9 J.	ALL	1 250 000
A_1	Ig.	6 J.	ALL	1 180 000
A_1	Ho.	14 J.	ALL	1 120 000
A_1	Mit.	2 J.	ALL	895 000
A_1	Sch.	13 J.	ALL	847 000
A_1	Di.	11 J.	ALL	782 000
A_1	Be.	10 J.	ALL	780 000
A_1	Mik.	7 J.	ALL	658 000
A_1	St.	15 J.	ALL	471 000
A_1B	Du.	9 J.	ALL	1 100 000
A_1B	Sch.	3 J.	ALL	760 000
A_2	Kö.	2 J.	ALL	600 000
A_2	x) Pf.	4 J.	ALL	301 000
A_2	Ti.	3 J.	ALL	267 000
A_2	Fe.	3 J.	ALL	215 000

x) unbehandelt

Die beiden mit x) gekennzeichneten Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch nicht behandelt worden.

Die Antigendichten von je 500 Erythrozyten eines ALL-Patienten und einer Normalperson werden in Abb. 11 gegenübergestellt.
Neben dem mit $0{,}78 \times 10^6$ Anti-A-Molekülen/Erythrozyt deutlich niedrigeren Mittelwert ist die Erythrozytenpopulation des ALL-Patienten auch weniger heterogen, d.h. es existiert eine größere Anzahl von Zellen mit gleicher oder sehr ähnlicher Antigenausprägung als es bei der Normalperson der Fall ist.

Abb. 11 Antigendichten in der Erythrozytenpopulation einer Normalperson (NP) und eines ALL-Patienten.



b.) CHRONISCHE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE (CLL)

Es wurden die Erythrozyten von 8 Patienten im Alter zwischen 48 und 78 Jahren untersucht, bei denen eine chronische lymphatische Leukämie diagnostiziert worden war. Sieben davon besaßen die Blutgruppe A_1, einer die Blutgruppe A_1B. Auch hier fanden sich Patienten, deren Erythrozyten eine den Normalpersonen vergleichbare Antigendichte aufwiesen, und solche, bei denen diese deutlich verringert war.

Tab. 17 Quantitative Ausprägung des Antigens A auf Erythrozyten von Patienten mit CLL.

PHÄNOTYP	PATIENT	ALTER	DIAGNOSE	ANTI-A-MOLEKÜLE PRO ERYTHROZYT
A_1	Er.	59 J.	CLL	1 450 000
A_1	Ec.	78 J.	CLL	1 140 000
A_1	Kr.	40 J.	CLL	915 000
A_1	Tr.	62 J.	CLL	845 000
A_1	Fi.	65 J.	CLL	799 000
A_1	Sch.	43 J.	CLL	622 000
A_1	Schw.	52 J.	CLL	391 000
A_1B	Du.	48 J.	CLL	843 000

c.) MYELOISCHE LEUKÄMIEN

Es wurden 5 Patienten mit verschiedenen myeloischen Leukämien untersucht.

Bei drei Vertretern der Blutgruppe A_1 war eine chronische myeloische Leukämie diagnostiziert worden.

Ein dreijähriges Kind mit sog. juveniler chronisch-myeloischer Leukämie (jCML) war zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch nicht behandelt worden.
In Tab. 18 ist dieser Patient mit " $^{x)}$" gekennzeichnet.

Weniger als ein Viertel im Vergleich zum Mittelwert der antigenen Bindungsstellen auf Erythrozyten von A_2-Normalpersonen wurde bei einem zum Zeitpunkt der Blutentnahme acht Monate alten Mädchen gefunden, welches bereits mit myeloischer Leukämie zur Welt kam.
Die Erythrozyten dieser Patientin, die unter zytostatischer Therapie stand, wurden in Abständen von einigen Monaten wiederholt untersucht; bei zwei Untersuchungen wurden Antigendichten errechnet, wie sie auch bei gesunden Spendern der Blutgruppe A_2 gefunden wurden. Bei der letzten Untersuchung allerdings war die Zahl der antigenen Bindungsstellen wieder deutlich vermindert.

Tab. 18 Quantitative Ausprägung des Antigens A auf Erythrozyten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), chronischer myeloischer Leukämie (CML) und sog. juveniler chronisch-myeloischer Leukämie(jCML)

PHÄNOTYP	PATIENT	ALTER	DIAGNOSE	ANTI-A-MOLEKÜLE PRO ERYTHROZYT
A_1	Sche.	35 J.	CML	1 840 000
A_1	Ro.	15 J.	CML	1 520 000
A_1	x) Le.	3 J.	jCML	850 000
A_1	Gi.	14 J.	CML	770 000
A_2	Scnm.		konnat.	
	17.03.76	8 Mo.	AML	135 000
	9.06.76	11 Mo.		499 000
	20.07.76	12 Mo.		525 000
	21.10.76	15 Mo.		294 000

x) unbehandelt

d.) AKUTE UNKLASSIFIZIERTE LEUKÄMIE

Eine Sonderstellung unter den untersuchten Leukämien nimmt der Fall einer akuten unklassifizierten Leukämie ein und wird deshalb gesondert dargestellt.

Der Patient, ein 55-jähriger Mann, befand sich seit längerem wegen eines Plasmozytoms in ambulanter Behandlung und Kontrolle durch eine Poliklinik. Wegen einer deutlichen Verschlechterung seines Allgemeinbefindens mit zunehmender Anämie und Thrombopenie erfolgte im Dezember 1976 die stationäre Aufnahme in die II. Medizinische Klinik des Klinikums Großhadern. Dort wurde als Grunderkrankung ein Plasmozytom mit mäßig ausgeprägter IgG-Paraproteinämie und IgA- und IgM-Immundefizit diagnostiziert. Daneben wurde ein Verdacht auf Plasmazellleukämie bzw. leukämische Form eines Immunozytoms und der Verdacht auf Erythroleukämie geäußert. Das Vorliegen einer Erythroleukämie konnte bei der zuletzt im Mai 1977 durchgeführten Untersuchung des Knochenmarkes nicht verifiziert werden. Das histologische Bild entsprach auch nicht eindeutig einem Plasmozytom, wenn dieses auch nicht auszuschließen war.
Ferner zeigte sich eine deutlich linksverschobene Megakaryopoese mit vermehrt Megakaryoblasten.

Erythrozyten für die Untersuchung auf die Ausprägung des Antigens A waren dem Patienten im August 1977 entnommen worden, drei Monate nach der letzten Bluttransfusion.

Die zuvor untersuchten Patienten mit einer leukämischen Erkrankung wiesen alle relativ einheitliche Zellpopulationen mit normaler oder verminderter A-Antigendichte auf.

Im Gegensatz dazu fanden sich bei diesem Patienten mit der Blutgruppe A_1 zwei völlig verschiedene Zellpopulationen, wie Abb. 12 zeigt. Die Auszählung von 500 Erythrozyten auf den Autoradiogrammen ergab, daß lediglich 44 % der Erythrozyten markiert waren, d.h. ^{125}J-Anti-A-IgG gebunden hatten. 56 % der Erythrozyten waren völlig unmarkiert.

Mit durchschnittlich 651 000 gebundenen Anti-A-Molekülen/Erythrozyt war die A-Antigendichte im Vergleich zu Normalpersonen deutlich vermindert.

Das Histogramm in Abb. 13 zeigt, daß neben der absoluten Verminderung der Antigenausprägung auch eine wesentlich geringere Schwankungsbreite innerhalb der markierten Zellen festzustellen war.

Abb. 12 Autoradiogramme von Erythrozyten einer Normalperson und eines Leukämiepatienten nach Inkubation mit ^{125}J-Anti-A-IgG.
A: A_1-Normalperson, X 1600
B: A_1-Akute, unklassifizierte Leukämie, X 1600

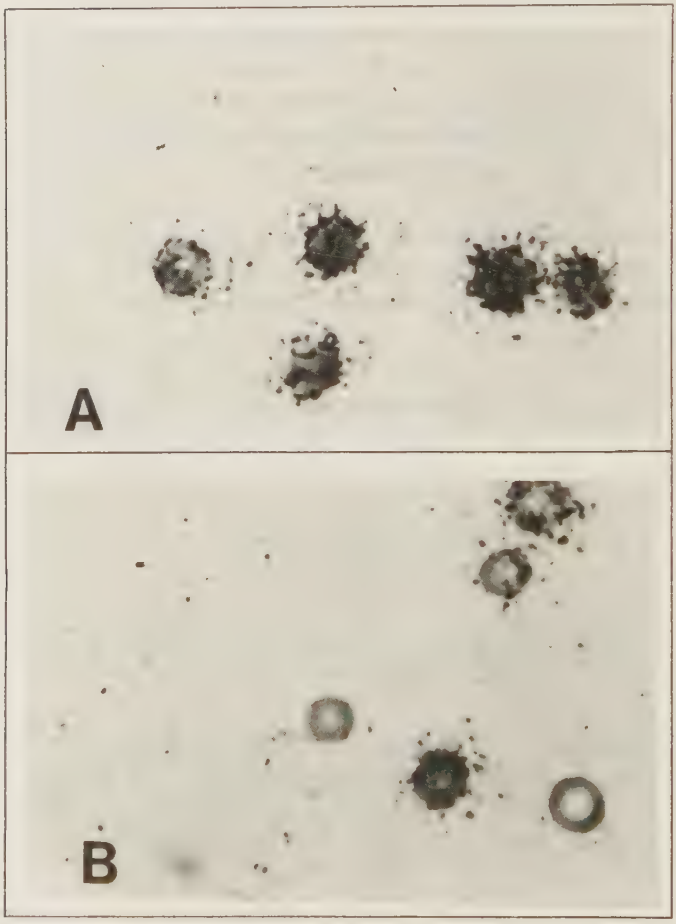
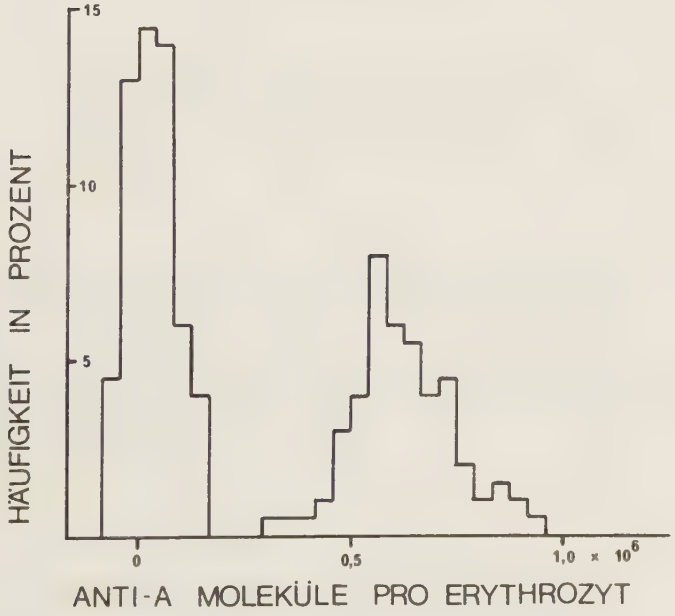


Abb. 13 A-Antigendichten auf 500 Erythrozyten eines Patienten mit einer unklassifizierten, akuten Leukämie.

Der peak auf der linken Bildhälfte stellt die unmarkierte Erythrozytenpopulation (kein Antigen A nachweisbar) dar, der rechte peak zeigt die Antigenausprägung der zweiten Zellpopulation.



e.) POLYCYTHAEMIA VERA (P.v.)

6 Patienten mit Polycythaemia vera im Alter zwischen 44 und 65 Jahren wurden ebenfalls auf die Ausprägung des Antigens A auf ihren Erythrozyten untersucht.

Von den 5 Patienten mit der Blutgruppe A_1 zeigten 3 deutlich niedrigere Werte. Mit Antigendichten zwischen 756 000 und 820 000/Erythrozyt stellte sich diese Verminderung ziemlich einheitlich dar.

Für den P.v.-Patienten mit Blutgruppe A_2 wurde mit 446 000 antigenen Bindungsstellen/Erythrozyt ein Wert errechnet, der an der Untergrenze der Werte von Normalpersonen liegt.

Tab. 19 Quantitative Ausprägung des Antigens A auf Erythrozyten von Patienten mit Polycythaemia vera.

PHÄNOTYP	PATIENT	ALTER	DIAGNOSE	ANTI-A-MOLEKÜLE PRO ERYTHROZYT
A_1	Gr.	54 J.	P.v.	1 500 000
A_1	Schm.	44 J.	P.v.	1 300 000
A_1	Th.	44 J.	P.v.	820 000
A_1	St.	52 J.	P.v.	809 000
A_1	Po.	65 J.	P.v.	756 000
A_2	Ei.	62 J.	P.v.	446 000

Die Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Antigendichten auf Erythrozyten von Polycythaemia-vera-Patienten im Vergleich zu Normalpersonen zeigen die Histogramme in den Abbildungen 14 und 15.

Im Falle des einen P.v.-Patienten (B) ist der Mittelwert der gebundenen Anti-A-Moleküle mit $0{,}82 \times 10^6$ Molekülen/Ery gegenüber der Normalperson deutlich vermindert, während der Mittelwert beim zweiten P.v.-Patienten (C) mit $1{,}5 \times 10^6$ Molekülen/Ery etwas höher als bei der Normalperson liegt.
In beiden Fällen aber ist die Variationsbreite geringer, d.h. auch hier ist eine größere Anzahl von Erythrozyten mit gleichen oder ähnlichen Antigendichten zu finden.

Auch im Vergleich einer A_2-Normalperson und einer A_2-Polycythaemia vera war ein niedrigerer Mittelwert und ein mehr uniformes Verteilungsmuster der Antigendichten im Falle der Polycythaemia vera zu verzeichnen (s. Abb. 15).

Abb. 14 Häufigkeitsverteilung bestimmter Antigendichten.

A = A_1-Normalperson
B = A_1-Polycythaemia vera
C = A_1-Polycythaemia vera

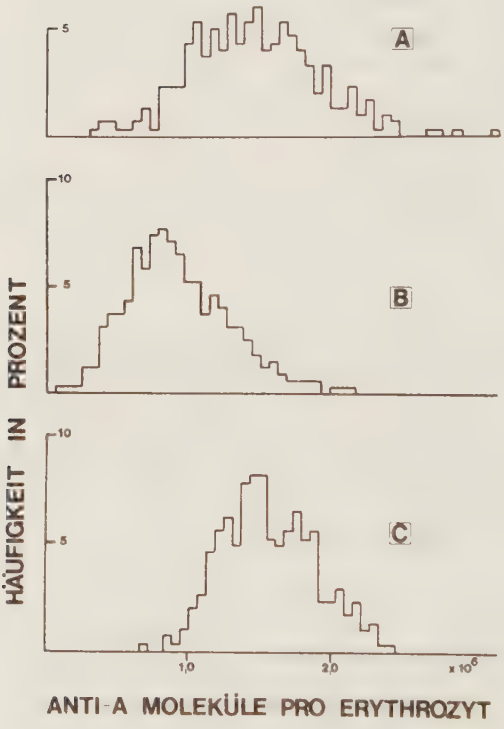
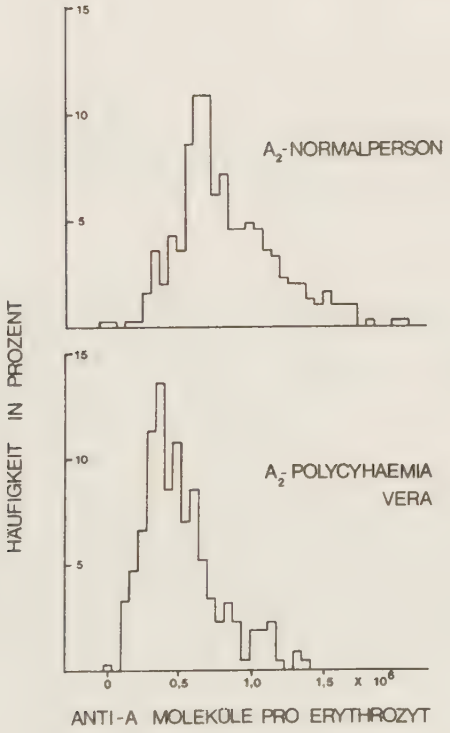


Abb. 15 Häufigkeitsverteilung bestimmter Antigendichten einer A_2-Normalperson und eines A_2-P.v.-Patienten.



f.) APLASTISCHE ANÄMIE

Die Erythrozyten aller vier untersuchten aplastischen Anämien wiesen deutlich weniger A-Antigen auf als die Erythrozyten von Normalpersonen.

Tab. 20 Quantitative Ausprägung des Antigens A auf Erythrozyten von Patienten mit aplastischer Anämie (apl.A.).

PHÄNOTYP	PATIENT	ALTER	DIAGNOSE	ANTI-A-MOLEKÜLE PRO ERYTHROZYT
A_1	Wi.	12 J.	apl.A.	862 000
A_1	Ho.	15 J.	apl.A.	505 000
A_1	Ke.	14 J.	apl.A.	350 000
A_1B	Sch.	9 J.	apl.A.	221 000

Einen Fall von aplastischer Anämie des Phänotyps A_1B im Vergleich zu A_1B-Erythrozyten einer Normalperson zeigt die Abb. 16.
Gut sind hier die Unterschiede der Silberkorndichten als Ausdruck der zellgebundenen ^{125}J-markierten Anti-A-Moleküle zu sehen. Die stark markierte Zelle unter den schwach markierten Erythrozyten des Aplasie-Patienten stammt aus einer vor der Blutentnahme durchgeführten Bluttransfusion.

Mit $0{,}35 \times 10^6$ für A_1-Erythrozyten und $0{,}22 \times 10^6$ für A_1B-Erythrozyten waren in dieser Patientengruppe auch die absolut niedrigsten Antigendichten des gesamten Untersuchungsgutes zu verzeichnen.

In Abb. 17 wird die Häufigkeitsverteilung von Zellen mit bestimmten Antigendichten in einem Fall von aplastischer Anämie mit zwei gesunden A_1-Spendern verschiedenen Alters verglichen.

Sowohl die erniedrigten durchschnittlichen Antigendichten/Erythrozyt als auch das Verteilungsmuster der Antigendichten weichen bei aplastischer Anämie (C) und 12 Tage altem Kind (B) in ähnlicher Weise von der erwachsenen Normalperson ab.

Abb. 16 A = Anti-A-^{125}J-markierte A_1B-Erythrozyten einer Normalperson, X 1600

B = Anti-A-^{125}J-markierte A_1B-Erythrozyten eines Patienten mit apl.A. und transfundierter Erythrozyt (⟶), X 1600

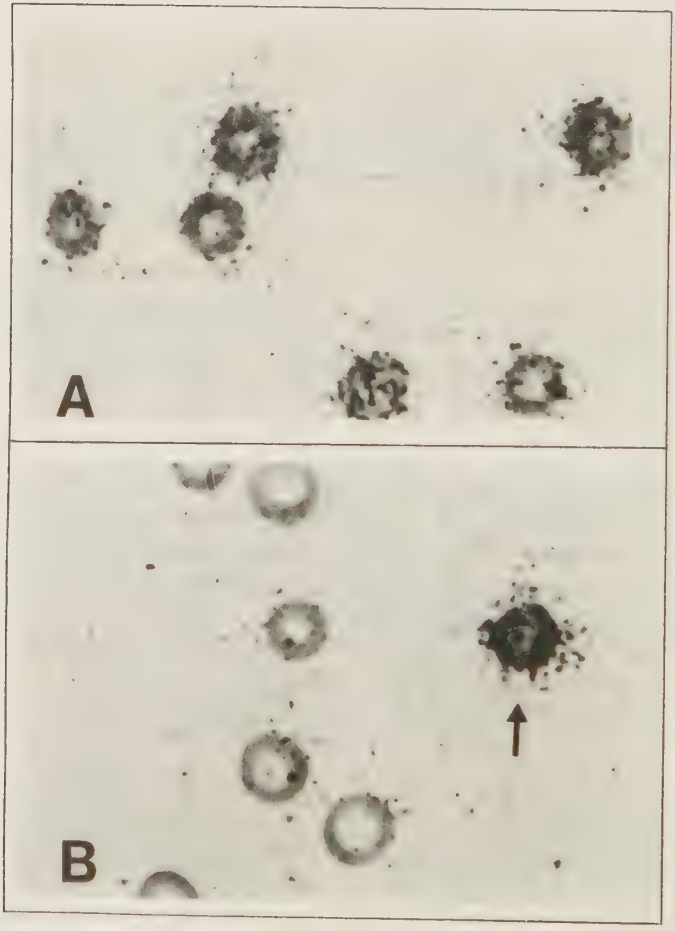
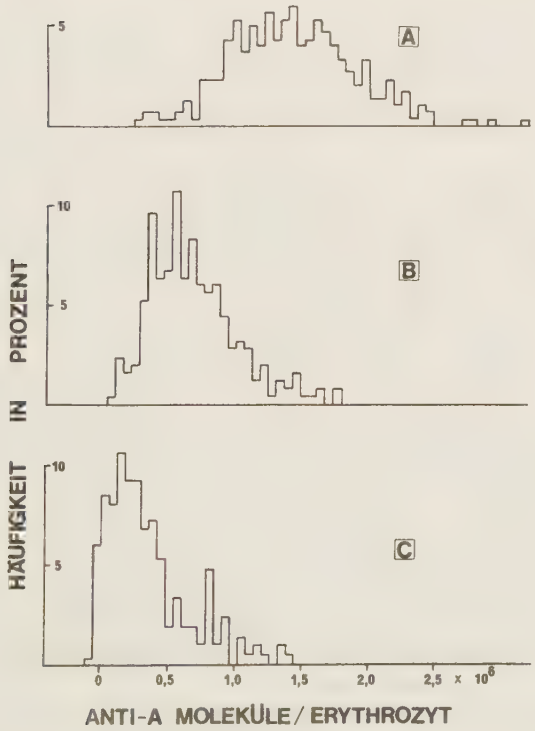


Abb. 17 Häufigkeitsverteilung bestimmter Antigendichten.

A = A_1-NP, Alter 33 Jahre

B = A_1-NP, Alter 12 Tage

C = A_1-apl.A., Alter 14 Jahre



3. VERGLEICH DER ANTIGENAUSPRÄGUNG BEI NORMALPERSONEN UND PATIENTEN

Nach der absoluten Quantifizierung der antigenen Bindungsstellen auf Erythrozyten von 42 Normalpersonen im Alter über 3 Monaten und 45 Patienten mit einer Erkrankung des Blutes wurden diese Ergebnisse verglichen.
Da im vorliegenden Untersuchungsgut kein Patient mit der Blutgruppe A_2B vorhanden war, mußte auf die vergleichende Darstellung von Normalpersonen und Patienten dieses Phänotyps verzichtet werden.

Abb. 18 zeigt die A-Antigendichten aller 45 Patienten im Vergleich zu den Normalpersonen.
Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, daß die A-Antigendichten einerseits bei einem Teil der Patienten zum Teil deutlich vermindert sind, andererseits aber auch durchaus im Bereich der Normalpersonen liegen können.

Über die Verteilung der Antigendichten im Kollektiv der A_1-Spender geben die Histogramme in Abb. 19 Auskunft. Die Verteilung bestimmter Antigendichten unter den Normalpersonen ist einer Normalverteilung - dargestellt durch die punktierte Linie - sehr ähnlich. Dabei liegt das Häufigkeitsmaximum beim arithmetischen Mittelwert von $1{,}375 \times 10^6$ Anti-A-Moleküle pro Erythrozyt; dieser arithmetische Mittelwert ist zugleich Medianwert.

Davon abweichend finden sich bei den A_1-Patienten im Bereich des arithmetischen Mittelwertes von $0{,}98 \times 10^6$ lediglich 3 Spender, während das Häufigkeitsmaximum im Bereich von 0,7 bis $0{,}85 \times 10^6$ Anti-A-Molekülen pro Erythrozyt liegt. Zusätzlich ist eine zweite Häufung in dem Bereich zu verzeichnen, in dem auch das Maximum der Normalpersonen liegt.

Abb. 18 Antigen-A-Ausprägung bei 45 Patienten verschiedener Erkrankungen des Blutes im Vergleich zu 42 Normalpersonen im Alter über 3 Monaten.

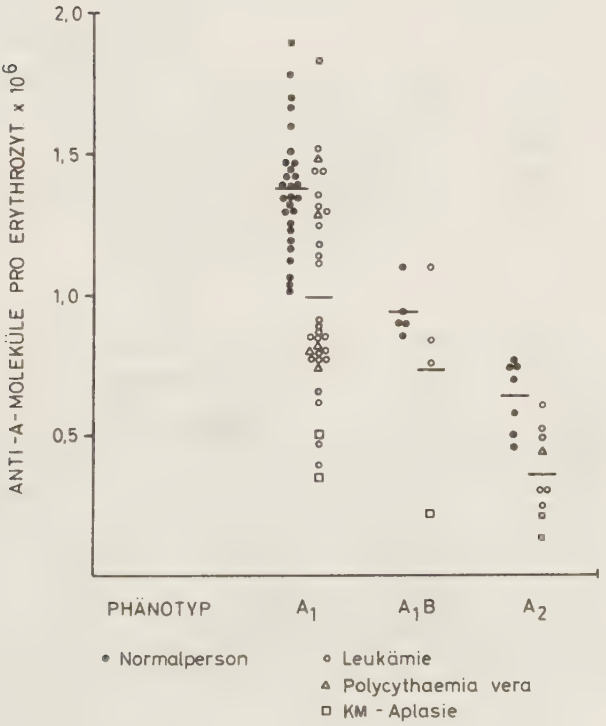
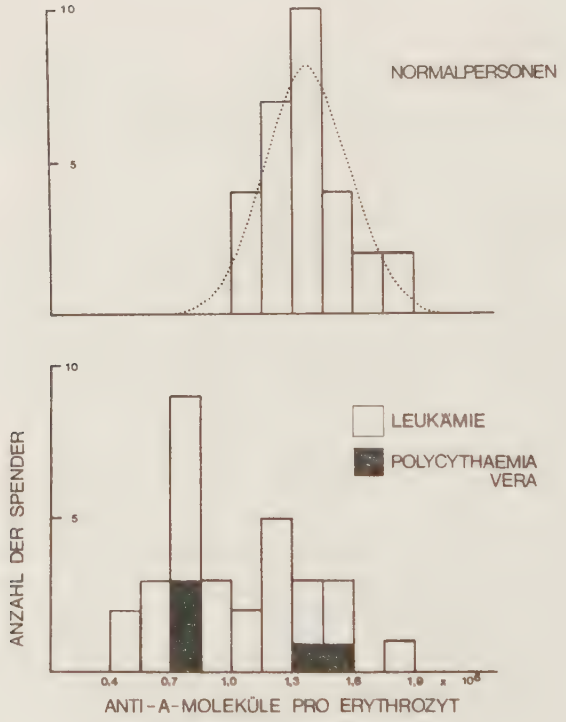


Abb. 19 Verteilung bestimmter Antigendichten im A_1-Spenderkollektiv.



4. PATIENTEN NACH KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION

In 2 Fällen wurde die A-Antigendichte von Patienten untersucht, die eine blutgruppengleich Knochenmarkstransplantation erhalten hatten.

Die Ergebnisse in Tab. 21 zeigen, daß die Antigendichte am 25. Tag nach der Übertragung von Knochenmark derjenigen ähnlich ist, wie sie bei Neugeborenen gefunden wurde.
Im Gegensatz dazu weisen die Erythrozyten des zweiten Patienten bereits 90 Tage nach der KM-Übertragung eine Antigendichte auf, wie sie auch bei Normalpersonen gefunden werden kann. Auch 9 Monate später war kein weiterer Anstieg der Antigendichte zu verzeichnen.

Tab. 21 Ausprägung des Antigens A nach Knochenmarks-Transplantation.

PHÄNOTYP-SPENDER-ALTER	DIAGNOSE	ZEIT NACH KM-TRANSPLANTATION	ANTI-A-MOLEKÜLE / ERYTHROZYT
A_1-On.-14J.	apl.An.	25 Tg.	221 000
A_1-Di.-12J.	ALL	90 Tg.	1 030 000
" 13J.	"	1 Jahr	1 040 000

5. NATÜRLICHER CHIMÄRISMUS

Ein Beispiel für das sehr seltene Vorkommen zweier Populationen von Erythrozyten mit verschiedener Blutgruppenzugehörigkeit bei einem Individuum stellt der natürliche Chimärismus dar.

In dem hier geschilderten Beispiel war ein 45-jähriger gesunder Mann dadurch aufgefallen, daß nach einer Blutspende Schwierigkeiten auftraten, seine Blutgruppenzugehörigkeit eindeutig festzustellen: Die Erythrozyten wurden sowohl durch Anti-A-Seren und Anti-A_1-Lectin als auch durch Anti-H-Lectin agglutiniert.

Wie sich die Erythrozyten nach Inkubation mit Anti-A-^{125}J auf dem Autoradiogramm darstellten, zeigt Abb. 20. Der Vergleich mit A_1- und O-Erythrozyten von Normalpersonen macht die Existenz von 2 Zellpopulationen, nämlich O- und A_1-Erythrozyten, deutlich. Die Höhe des Anteils der antigendifferenten Erythrozyten an der Gesamtzahl, nämlich 88 % O-Erythrozyten und 12 % A_1-Erythrozyten, wurde durch Messung der Silberkorndichten von 1000 Erythrozyten ermittelt.

Ein Vergleich der A_1-Erythrozyten mit den Erythrozyten einer A_1-Normalperson zeigte - wie in Abb. 21 zu sehen ist - daß mit $1{,}45 \times 10^6$ Anti-A-Molekülen pro Erythrozyt nicht nur ein Mittelwert, sondern auch ein Antigenverteilungsmuster ähnlich dem von Normalpersonen gefunden wurde.

Abb. 20 Autoradiogramme von Erythrozyten nach Inkubation mit Anti-A-^{125}J, X 1600

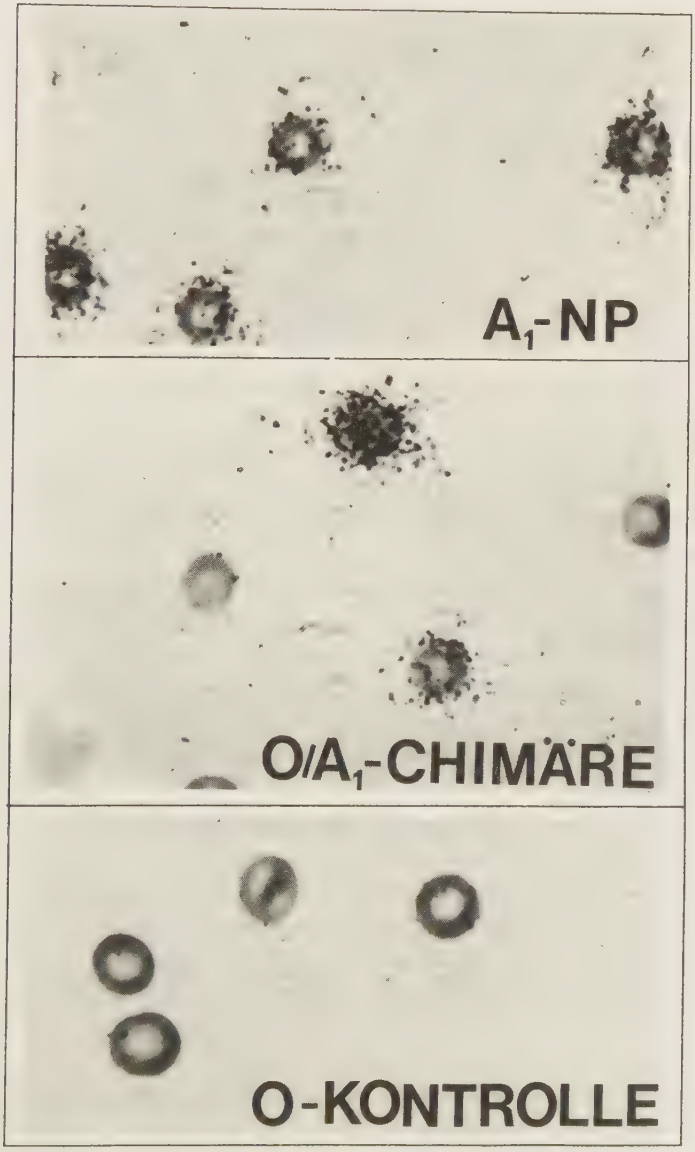
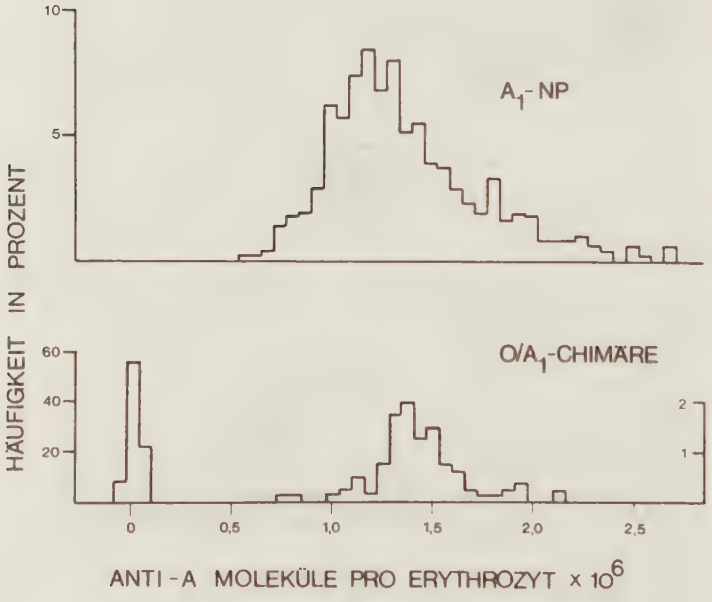


Abb. 21 Antigendichten einer Normalperson und einer O/A_1-Chimäre.
Untere Bildhälfte: Die Prozenteinteilung auf der linken Bildseite ist für die O-Erythrozyten, die auf der rechten für die A_1-Erythrozyten gültig.



6. ERYTHROZYTEN UNTERSCHIEDLICHER DICHTE

Nach der Trennung in zwei Fraktionen unterschiedlicher Dichte (siehe Kap. III. 2.) wurden Erythrozyten fünf verschiedener Spender auf die Ausprägung des Antigens A untersucht.
Wie bei allen Versuchen wurde auch hier ein Kontrollansatz mit Erythrozyten der Blutgruppe O durchgeführt, die zuvor ebenfalls in eine weniger dichte und eine dichtere Fraktion aufgetrennt worden waren. Die Fraktion der weniger dichten, jüngeren O-Erythrozyten band auf dem Wege der unspezifischen Bindung 11,8 % mehr Antikörpermoleküle als die dichteren, älteren Erythrozyten.

Bei der Betrachtung der Erythrozyten im Mikroskop war hier, wie auch bei den jeweils zwei Fraktionen der anderen fünf untersuchten Spender, ein deutlicher Größenunterschied der Erythrozyten festzustellen. Direkte Messungen von je 100 Erythrozyten durch ein graduiertes Okular des Mikroskops ergaben, daß die weniger dichten, jüngeren Erythrozyten mit einem mittleren Zelldurchmesser von 7,2 μ gegenüber den dichteren, älteren Zellen mit 6,83 μ größer waren. Bei den A_1-Erythrozyten von 2 Spendern wurde eine Größe von 7,04 μ bzw. 6,87 μ für die jüngeren, verglichen mit einer Größe von 6,53 μ bzw. 6,45 μ für die älteren Erythrozyten, gemessen.
Da eine größere Zelloberfläche auch die unspezifische Bindung erhöhen kann, wurde von den Werten der weniger dichten Erythrozyten der Wert der weniger dichten O-Erythrozyten als unspezifische Antikörperbindung abgezogen. Im Falle der dichteren Erythrozyten wurde mit Abzug des Wertes für die dichteren O-Erythrozyten entsprechend verfahren.

In allen fünf untersuchten Fällen banden die weniger dichten, jüngeren und auch größeren Erythrozyten auch

spezifisch mehr Anti-A-Moleküle als die dichteren, älteren und kleineren Erythrozyten desselben Spenders. Die Größenordnung der Unterschiede variierte hier allerdings beträchtlich. Mit 6,8 % banden die jüngeren, größeren Erythrozyten einer A_1-Normalperson nur wenig mehr Antikörper als die dichteren kleineren Erythrozyten. Der größte Unterschied zwischen den zwei Zellfraktionen eines Spenders wurde mit über 33 % bei einem A_1-Spender mit Polycythaemia vera gefunden.

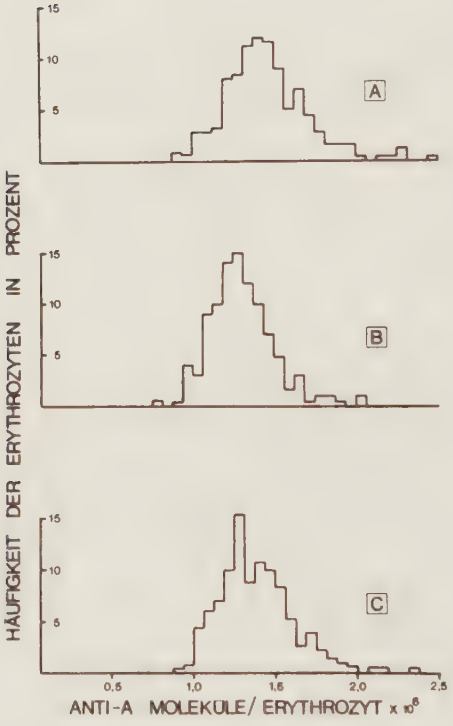
Über die unterschiedliche Antikörperbindung von jüngeren und älteren Erythrozyten aller fünf Spender gibt Tab. 22 Auskunft.
Zum Vergleich des Verteilungsmusters der Antigendichten jüngerer bzw. älterer Erythrozyten mit dem der gesamten Zellpopulation wurde die Anzahl gebundener Anti-A-Moleküle bei je 300 Erythrozyten beider Fraktionen gemessen.

Wie in Abb. 22 zu sehen ist, wiesen jüngere bzw. ältere Zellen ein ähnlich heterogenes Antigenmuster auf, wie es auch die Gesamtpopulation der Erythrozyten verschiedener Spender besaßen (vgl. Abb. 7,8A,11,14A,15,17,21). Dadurch wird ersichtlich, daß die breite Streuung der Antigendichten auf Erythrozyten nicht durch das Zellalter verursacht wird.

Tab. 22 Vergleich der errechneten Antigendichten auf Erythrozyten verschiedener Spender nach Auftrennung der gesamten Zellpopulation in 2 Fraktionen unterschiedlicher Dichte der Zellen.

ART DER ERYTHROZYTEN	ANTI-A-MOLEKÜLE/ERY	% DIFFERENZ
O-NP-jüngere E. (niedrige Dichte)	123 000	11,8
O-NP-ältere E. (hohe Dichte)	110 000	
A_1-NP-jüngere E.	1 512 000	16,5
A_1-NP-ältere E.	1 300 000	
A_1-NP-jüngere E.	1 071 000	6,8
A_1-NP-ältere E.	1 002 000	
A_1-Polycyth.v.-jüngere E.	1 485 000	33,4
A_1-Polycyth.v.-ältere E.	1 113 000	
A_2-NP-jüngere E.	700 000	12,0
A_2-NP-ältere E.	625 000	

Abb. 22 Histogramme der Antigendichten von je 300 Erythrozyten der Fraktionen jüngerer bzw. älterer Zellen.
A = "junge" Erythrozyten (niedrige Dichte)
B = "alte" Erythrozyten (hohe Dichte)
C = Gesamtpopulation



7. ANTIGENAUSPRÄGUNG UND GESCHLECHT DER SPENDER

Signifikante geschlechtsgebundene Unterschiede in der Anzahl der gebundenen Anti-A-Moleküle/Erythrozyt konnten nicht festgestellt werden.

Die Mittelwerte der antigenen Bindungsstellen von Erythrozyten männlicher und weiblicher A_1-Spender (Normalpersonen und ALL-Patienten) zeigt Tab. 23.

Tab. 23 Antigenausprägung bei männlichen und weiblichen Spendern der Blutgruppe A_1.

GESCHLECHT DER SPENDER	ANTI-A-MOLEKÜLE/A_1-ERY
NP-männlich (n=13)	1 340 000
NP-weiblich (n=16)	1 420 000
ALL-männlich (n= 8)	1 040 000
ALL-weiblich (n= 6)	960 000

D. DISKUSSION

Untersuchungen über die Ausprägung von Blutgruppenantigenen auf der Erythrozytenmembran beschäftigten besonders in jüngster Vergangenheit eine beträchtliche Zahl von Autoren. Dabei kamen verschiedene Techniken zur Anwendung, die zum Teil Aussagen über die quantitative Ausprägung der Blutgruppenantigene auf der Zellmembran machen konnten.

Besonders häufige Verwendung fand bisher die Technik des Radioimmunoassays; hierbei wurde die Bindung radioaktiv markierter Substanzen mit Anti-A-Spezifität (Lectin, IgG) an eine große Zahl von Erythrozyten gemessen und die Stoffmenge errechnet, die eine einzelne Zelle durchschnittlich gebunden haben mußte. Ein erheblicher Nachteil dieser Technik ist, daß keine Aussagen über das Verteilungsmuster von Antigendichten innerhalb einer Zellpopulation gemacht werden können. Darüberhinaus bleibt das Vorhandensein zweier Zellpopulationen innerhalb eines Spenderblutes unerkannt. Würde man z.B. die Erythrozyten der von uns untersuchten O/A_1-Chimäre (Kap. C,V.5.) mit dieser Technik untersuchen, so würde ein Durchschnittswert von etwa 145 000 gebundenen Anti-A-Molekülen/Ery ermittelt. In der Tat aber lagen 88 % O-Erythrozyten und 12 % A_1-Erythrozyten mit einem Mittelwert von 1 450 000 Anti-A-Molekülen/Ery vor. Als weiteres Beispiel können transfundierte Erythrozyten, die eine von den Empfängererythrozyten unterschiedliche Antigenausprägung haben, bei dieser Technik nicht erkannt und untersucht werden (Abb. 16). Die Auswirkungen einer möglichen Agglutination auf das Maß der Bindung von Anti-A-Substanz sind schwer einzuschätzen, und auch die Tatsache, daß die Morphologie der zu untersuchenden Zellen nicht beurteilt werden kann, stellt einen weiteren Nachteil dar.

Ein weiterer, nicht unerheblicher technischer Nachteil kann darin liegen, daß, wie in Kap. C,I. gezeigt wurde, nicht zellgebundene Radioaktivität im Radioimmunoassay pauschal mitgemessen wird. Falls hierfür keine experimentellen Vorkehrungen getroffen werden, muß mit einem erheblichen Ausmaß an unspezifischer Radioaktivität, die nicht von den Zellen herrührt, gerechnet werden. Dadurch erklären sich die hohen unspezifischen Anteile in den Untersuchungen mancher Autoren, die bis zu 75 % unspezifische Bindung kalkulieren müssen, wodurch die Wertigkeit des spezifischen Anteils in Frage gestellt wird (5,37).

Eine andere Technik zur Untersuchung von Membranantigenen ist die elektronenoptische Untersuchung der Erythrozyten, nachdem diese mit ferritinmarkiertem Anti-A-IgG oder Dolichos-bif.-Lectin inkubiert worden waren. Die absolute Menge des zellgebundenen Anti-A-Immunglobulins oder Dolichos-biflorus-Lectins, die pro Erythrozyt gebunden wurde, wird durch Auszählung der Ferritinpartikel bestimmt. Durch Abmessung des zur Auszählung herangezogenen Membranabschnitts und bei Kenntnis der Schnittdicke des Präparates kann die Anzahl der gebundenen Ferritin-Antikörper-Konjugate pro Flächeneinheit angegeben werden. Setzt man diesen Wert in Bezug zur Gesamtoberfläche des Erythrozyten, so erhält man die Zahl der antigenen Bindungsstellen/Erythrozyt. Dabei wird angenommen, daß sich ein Ferritinpartikel mit einem Lectin- (38) bzw. mit einem Immunglobulinmolekül (39) verbindet.
Zwar besitzt diese elektronenmikroskopische Technik gegenüber dem Radioimmunoassay den Vorteil, daß damit einzelne Zellen untersucht werden können, aber sie ist bei der Berechnung der antigenen Bindungsstellen bezüglich der Oberfläche eines Erythrozyten auf einen schwer objektiv faßbaren Parameter angewiesen. Ist schon die Annahme einer konstanten Schnittdicke der Präparate

von ca. 600 Å eine mögliche Fehlerquelle, so gilt dies in besonderem Maße für den eingesetzten Wert der Erythrozytenoberfläche. Hier variieren die Angaben verschiedener Autoren bis über 30 %, wie Tabelle 24 veranschaulicht.

Tab. 24 Größenangaben über die Erythrozytenoberfläche bei verschiedenen Verfassern.

AUTOR	DURCHSCHNITTSWERT DER GESAMT-POPULATION IN μ^2	NACH DICHTETRENNUNG "leichte Erys"	"schwere Erys"
v.GASTEL (40)	126	148	124
MATSUKURA (39)	128	-	-
WINTROBE (41)	140	-	-
MATSUKURA (42)	145	-	-
WESTERMANN (43)	-	150	140
MASOUREDIS (44)	145	-	-
PONDER (45)	165	-	-

Die Möglichkeit, daß sich eventuell zwei Antikörpermoleküle bei ihrer Konkurrenz um den "Rezeptor" räumlich derart behindern, daß die antigene Bindungsstelle letztlich nicht besetzt werden könnte, ist bei einem Molekulargewicht von 600 000 für das Ferritinkonjugat verglichen mit 160 000 für das IgG-Molekül nicht auszuschließen. Dieser experimentelle Unsicherheitsfaktor ist bei Isotopentechniken wie Radioimmunoassay oder Immunautoradiographie zu vernachlässigen.
Der erhebliche Zeitaufwand der Auszählung der Ferritinpartikel bringt als zusätzlichen Nachteil mit sich, daß nur eine begrenzte Anzahl von Zellen untersucht werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Ausprägung des Blutgruppenantigens A auf Erythrozyten erstmals mit der Technik der quantitativen photometrischen Immunautoradiographie untersucht. Die Vorteile dieser Technik gegenüber Radioimmunoassay und elektronenoptischer Zählung der Ferritinpartikel sind folgende:

1.) Durch einen einfachen Meßvorgang, der pro Zelle nur wenige Sekunden dauert, kann eine große Zahl von einzelnen Erythrozyten gemessen werden; dadurch wird es möglich, auch das Verteilungsmuster der Antigendichte innerhalb einer Zellpopulation zu erkennen.

2.) Es besteht die Möglichkeit der morphologischen Betrachtung des Untersuchungsmaterials.

3.) Eine hohe Reproduzierbarkeit (s. Kap. C,II.3.), vor allem auch dadurch, daß mit den Testzellen auf demselben Objektträger eine radioaktive Referenzquelle mitexponiert wird.

4.) Unabhängigkeit von schwer definierbaren Größen wie der Erythrozytenoberfläche.

5.) Es werden nur isoliert liegende Zellen gemessen; Auswirkungen einer Agglutination müssen nicht berücksichtigt werden.

6.) Es können glutaraldehydfixierte Erythrozyten verwendet werden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, an das Mikroskopphotometer eine Recheneinheit und ein Lochstreifenstanzgerät anzuschließen. Über Computer können dadurch auf einfachem Wege Histogramme der Antigenausprägung innerhalb einer Zellpopulation erstellt werden.

Vor der immunautoradiographischen Untersuchung der Membranantigene waren die Erythrozyten stets in 0,25 %-iger Glutaraldehydlösung fixiert worden. Dieser Aldehyd wurde seit langem, besonders in der Histologie von Gewebeschnitten, als Fixativ verwendet und wird auch häufig bei der Fixierung von Erythrozyten eingesetzt (22,39,46, 47,48,49).
Die Vorteile der Verwendung glutaraldehydfixierter Erythrozyten, die die Fähigkeit behalten, spezifisch Antikörper zu binden (39,49) sind folgende:

1.) Die Agglutinabilität wird herabgesetzt.

2.) Die Zellen sind vor mechanischer Lyse beim Zentrifugieren und Resuspendieren geschützt.

3.) Es tritt keine Redistribution von Membranantigenen ein.

4.) Die Aufbewahrung der Erythrozyten über einen Zeitraum von mindestens 16 Monaten ist möglich, ohne daß Veränderungen der Membranantigene auftreten.

Die Mitteilung von MATSUKURA (39), daß glutaraldehydfixierte Erythrozyten kein Antikörperprotein unspezifisch binden, kann aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung nicht bestätigt werden (s.Kap. C,II.1.). Wenn die unspezifische Proteinbindung, die wohl Ausdruck einer kovalenten Bindung durch verbleibende Aldehydgruppen ist, auch durch Vorwaschungen mit proteinhaltigen Medien verringert werden kann, müssen dennoch bei sämtlichen Versuchen spezifische Kontrollen durchgeführt werden, um das Ausmaß der unspezifischen Bindung exakt ermitteln und von der spezifischen Bindung subtrahieren zu können.
Um die oben genannten Vorteile der Glutaraldehydfixierung für die in dieser Studie verwendete Versuchsanordnung nutzbar zu machen, war die Fixierung der Zellen mit einer 0,25 %-igen Glutaraldehydlösung völlig ausreichend.

Die Verwendung vier- bis fünffach höherer Konzentrationen, wie sie von einigen Autoren angegeben werden (22,39,46,49), erbringt keine zusätzlichen Vorteile und erhöht die unspezifische Bindung.

Glutaraldehydfixierte Erythrozyten sind allerdings für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ungeeignet (50), und auch die Darstellung HbF-haltiger Erythrozyten nach der Elutionsmethode von KLEIHAUER und BETKE (51) gelingt bei fixierten Erythrozyten nicht (eigene Beobachtung).

Beim Vergleich der bisher durchgeführten quantitativen Untersuchungen der Antigen-A-Ausprägung fällt auf, daß sechs Autoren mit 650 000 - 1 034 000 antigenen Bindungsstellen auf A_1-Erythrozyten bzw. 75 000 - 260 000 für A_2-Erythrozyten Werte ermittelten, die etwa in derselben Größenordnung liegen (s. Tab. 25). Zwei weitere Autoren ermittelten jedoch mit 7,3 - 10 x 10^6 antigenen Bindungsstellen für A_1-Erythrozyten bzw. 7 x 10^6 für A_2-Erythrozyten etwa 10-fach (A_1) bzw. 33-fach (A_2) höhere Werte. Die Ursache dieser Diskrepanz ist zweifellos in der dabei angewandten Technik zu suchen.

BOYD (5) untersuchte die antigenen Bindungsstellen für das Antigen A mit Hilfe des Radioimmunoassays und einem ^{131}J-markierten Lectin der Limabohne. Er inkubierte Erythrozyten mit diesem Lectin bis zu einem Verhältnis Lectin:Erythrozyten wie 320:1, ohne jedoch einen Sättigungsbereich zu erreichen. In diesem Bereich hatten O- bzw. B-Erythrozyten über 33 Millionen Lectinmoleküle gebunden, was einer unspezifischen Bindung von mehr als 75 % entspricht. Als mögliche Ursachen für die außergewöhnlich hohen Werte sowohl der spezifischen als auch der unspezifischen Bindung diskutiert BOYD folgen-

de Ursachen: 1. Eine Art Polymerisation der Lectinmoleküle in Anwesenheit von Erythrozyten.

2. Das Eindringen von Lectinmolekülen tief ins Zellstroma, wo sie mit Rezeptoren reagieren, die normalerweise den Agglutininen nicht zugänglich sind.

3. Die Möglichkeit, daß das Limabohnenlectin sich mit allgemeinen Membranbestandteilen wie Monosacchariden, Aminosäuren oder Nucleotiden verbindet.

FUJISAWA et al. (52) schätzten die Zahl antigener Bindungsstellen aufgrund der Anzahl von enzymatisch freigesetzten N-acetyl-galaktosamin-Molekülen. Dabei wurde angenommen, daß jedes Molekül von einer antigenen Bindungsstelle stamme.
ECONOMIDOU et al. (6) allerdings sind der Meinung, daß nicht jedes dieser Moleküle notwendigerweise von einer antigenen Bindungsstelle stammen muß, sondern ebenfalls von Zellstrukturen herrühren kann, die keine antigenen Bindungsstellen darstellen.

Tab. 25 Schätzungen der Anzahl antigener Bindungsstellen für das Antigen A auf A_1- und A_2-Erythrozyten durch verschiedene Autoren.

AUTOR	TECHNIK	ZAHL DER ANTIGENEN BINDUNGSSTELLEN /Ery	
		A_1	A_2
BOYD et al. 1962 (5)	Radioimmunoassay ^{131}J-markiertes Lectin der Limabohne	10 000 000	7 000 000
GREENBURY et al. 1963 (14)	Radioimmunoassay ^{131}J-markiertes Anti-A-IgG vom Kaninchen	830 000	200 000
FUJISAWA et al. 1963 (52)	Berechnung der Anzahl enzymatisch freigesetzter N-acetyl-galactosamin Moleküle. Annahme: Molekülzahl entspricht antigenen Bindungsstellen	7 300 000	----
ECONOMIDOU et al. 1967 (5)	Radioimmunoassay Gereinigtes ^{125}J-markiertes Anti-A-IgG vom Kaninchen	1 034 000	260 000
WILLIAMS u. VOAK 1972 (38)	Elektronenmikroskopie Ferritin-markiertes Dolichos bif. Lectin	800 000	150 000
MATSUKURA 1972 (39)	Elektronenmikroskopie Ferritin-konjugiertes Anti-A	650 000	75 000
CARTRON et al. 1974 (53)	Radioimmunoassay Gereinigtes ^{125}J-markiertes Anti-A-IgG vom Kaninchen	850 000	240 000
HOLBURN 1976 (54)	Radioimmunoassay ^{125}J-markiertes human Anti-A-IgG	1 010 000	-----

Die übrigen 6 Autoren, deren Ergebnisse relativ gut übereinstimmen, untersuchten die Antigenausprägung entweder mit Hilfe des Radioimmunoassays oder elektronenoptisch nach Inkubation der Erythrozyten mit Ferritin-Anti-A-Konjugaten.

GREENBURY (14) errechnete mit Hilfe des Radioimmunoassays, daß A_1-Erythrozyten durchschnittlich 830 000, A_2-Erythrozyten 200 000 Anti-A-IgG-Moleküle gebunden hatten. Diese Werte wurden für die maximale Antikörperkonzentration, die verwendet wurde, errechnet, wobei allerdings eingeräumt wird, daß der Sättigungspunkt nicht ganz erreicht wurde.

Mit 1 034 000 für A_1- bzw. 260 000 Anti-A-Molekülen für A_2-Erythrozyten errechneten ECONOMIDOU und Mitarbeiter (6) mit der Technik des Radioimmunoassays sehr ähnliche Werte. Allerdings lag hier der Höchstwert eines A_1-Spenders mit 1 170 000 antigener Bindungsstellen/Ery doch etwa 40 % über dem von GREENBURY angegebenen Höchstwert. Mit 850 000 gebundenen Anti-A-Molekülen/A_1B-Erythrozyt wies hier ein A_1B-Spender sogar mehr antigene Bindungsstellen auf als GREENBURY als Maximum für A_1-Spender errechnete.

Für eher zu niedrig halten WILLIAMS und VOAK (38) ihre Schätzungen der antigenen Bindungsstellen mit 800 000 für A_1- und 150 000 für A_2-Erythrozyten. Bei den Versuchen dieser Autoren mit ferritinmarkiertem Dolichos-biflorus-Lectin waren etwa 50 % der Lectinmoleküle nicht mit ^{131}J markiert und konnten bei der Berechnung nicht berücksichtigt werden, obschon sie sicherlich einen Teil der antigenen Bindungsstellen für das Antigen A besetzt hatten.

Für die Untersuchung der quantitativen Ausprägung des Blutgruppenantigens A (A_1 und A) und vergleichende Untersuchungen dieser Antigenausprägung auf A_1- und A_2-Erythrozyten ist die Eignung des Dolichos-biflorus-Lectins allerdings sehr zweifelhaft, da es hauptsächlich mit dem Antigen A_1 reagiert. Die Reaktion mit A_2-Erythrozyten ist deshalb schwach und mit A_2B-Erythrozyten praktisch negativ (3).

Daß sich die Markierungsdichte der Erythrozyten von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich darstellte, konnten WILLIAMS und VOAK aufgrund der elektronenoptischen Untersuchung feststellen; für die am stärksten markierten A_1-Zellen wurde mit 4 600 000 Lectinmolekülen ein Vielfaches des Durchschnittswertes ermittelt.

Daß die Erythrozyten innerhalb einer Zellpopulation eine sehr unterschiedliche Antigenausprägung besitzen beobachtete auch MATSUKURA (39) bei der elektronenoptischen Untersuchung mit Ferritin-konjugiertem-Anti-A. Mit 280 000 für die am schwächsten markierten Erythrozyten und 1 070 000 für die am stärksten markierten Erythrozyten ist die Schwankungsbreite auch hier erheblich.
Die in der Untersuchung von MATSUKURA angegebenen Werte der antigenen Bindungsstellen sind wohl als zu niedrig einzuschätzen, da der Autor bei seinen Berechnungen eine Erythrozytenoberfläche von nur 128 μ^2 zugrunde legt (vgl. Tab. 23). In einer Untersuchung über die Anzahl der antigenen Bindungsstellen für das Antigen H verwendet MATSUKURA (42) interessanterweise mit 145 μ^2 für die Erythrozytenoberfläche einen höheren Wert.

CARTRON's Schätzungen (53) über die Zahl der antigenen Bindungsstellen auf A_1- und A_2-Erythrozyten liegen zwar in derselben Größenordnung der bisher genannten Autoren,

doch wurde hier unter acht A_2-Spendern mit 440 000 Anti-A-Molekülen/A_2-Ery der weitaus höchste Wert für diese Blutgruppe ermittelt. Auch CARTRON nennt als mögliche Fehlerquelle unter anderem eine ungenügende Sättigung aller antigenen Bindungsstellen mit Anti-A-IgG-Molekülen.

Die einzige Untersuchung mit einem Human-Anti-A-IgG wurde von HOLBURN (54) durchgeführt. Mit etwa 1 Million Bindungsstellen/A_1-Ery unterscheidet sich das Ergebnis allerdings kaum von den übrigen Schätzungen.

Einige quantitative Untersuchungen wurden auch über die Ausprägung eines weiteren Blutgruppenantigens des ABH-Systems, nämlich des Antigens B, durchgeführt (Tab. 26). Bei der Betrachtung der Resultate dieser Arbeiten läßt sich feststellen, daß die Zahl der antigenen Bindungsstellen für das Antigen B etwa in derselben Größenordnung liegt, wie sie für das Antigen A auf A_1-Erythrozyten ermittelt wurde.

Tab. 26 Schätzungen der Anzahl antigener Bindungsstellen für das Antigen B auf Erythrozyten der Blutgruppe B von Erwachsenen.

AUTOR	ANTIGENE BINDUNGSSTELLEN/ERY
ECONOMIDOU et al. 1967(6)	620 000 - 830 000
HARPAZ et al. 1975 (37)	2 200 000
HOLBURN 1976 (54)	920 000 - 2 200 000

Vergleicht man nun die bisher gemachten Angaben über die Ausprägung des Antigens A auf Erythrozyten von erwachsenen Normalpersonen mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung, so ist folgendes festzustellen:

1.) Der hier durch Untersuchung von neun A_1-Spendern errechnete Mittelwert von 1 336 000 Anti-A-Molekülen/A_1-Ery liegt um etwa 30 - 50 % höher als die bisherigen Schätzungen.

2.) Um etwa denselben Prozentsatz höher liegen mit 938 000 Anti-A-Molekülen/A_1B-Ery die Werte für die Blutgruppe A_1B. Hier gaben ECONOMIDOU 626 000, GREENBURY etwa 750 000 und MATSUKURA 580 000 antigene Bindungsstellen/Ery an.

3.) Bei der Blutgruppe A_2B liegen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit 229 000 gegenüber den Angaben von ECONOMIDOU mit 120 000 und GREENBURY mit 180 000 ebenfalls etwas höher.

4.) Die größte Diskrepanz zu bisher gemachten Angaben erbrachte die Untersuchung von 6 Spendern der Blutgruppe A_2. Mit einem Mittelwert von 638 000 wurden in dieser Untersuchung drei- bis vierfach höhere Antigendichten gemessen. Lediglich CARTRON hatte mit max. 440 000 in dieser Blutgruppe noch einen Wert ermittelt, der den Ergebnissen dieser Untersuchung nahekommt, wo die Werte im Bereich zwischen 460 000 und 760 000 zu finden waren.

Dadurch, daß die Anzahl der antigenen Bindungsstellen auf A_2-Erythrozyten in dieser Untersuchung drei- bis viermal höher, die auf A_1-Erythrozyten dagegen nur um wenig höher liegen als die Angaben anderer Autoren, ergibt das Verhältnis der Antigendichte von A_1:A_2-Erythro-

zyten mit etwa 2:1 eine andere Relation. Die größte Differenz gab MATSUKURA mit etwa 8:1 an; mit einem Verhältnis von A_1:A_2 wie 3,5:1 fand bisher CARTRON den geringsten Unterschied. Meistens jedoch wurde auf A_1-Erythrozyten eine vier- bis fünffach höhere Antigendichte gefunden (6,14,38).
Mit der Technik des elektronenmikroskopischen Nachweises der Blutgruppensubstanz A mit ferritin- und goldmarkiertem Protektin von Helix pomatia, die allerdings keine quantitativen Aussagen erlaubt, bestätigen WAGNER und WAGNER (55) dieses Verhältnis von 4:1.

Bei der Klärung der Frage, warum die Angaben über das Verhältnis der A-Antigendichten auf A_1- und A_2-Erythrozyten so sehr differieren, steht vermutlich das Problem der Antikörperabsättigung aller antigenen Bindungsstellen im Mittelpunkt. Einen Hinweis dafür findet man auch in der Untersuchung von GREENBURY, der bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen ein unterschiedliches A_1:A_2 - Verhältnis gefunden hatte. Bei einer Verdünnung des heterologen Anti-A von 1:32 banden A_1-Erythrozyten 5,5-mal mehr Antikörper als A_2-Erythrozyten. Dieses Verhältnis wurde bei zunehmender Antikörperkonzentration kontinuierlich immer enger und betrug beim unverdünnten Serum nur noch 4,2:1.
Auch in der vorliegenden Untersuchung (s. Kap. C,IV.) wurde bei verschiedenen Verdünnungsstufen des Antikörpers ein unterschiedliches Verhältnis der Antigendichten auf A_1- und A_2-Erythrozyten gefunden.
Bei einer Antikörperkonzentration, in der, wie die Sättigungstitrationen ergaben, alle antigenen Bindungsstellen abgesättigt waren, banden A_1-Erythrozyten sowohl bei direkter als auch bei indirekter Markierung (s. Kap. C,III.) doppelt so viele Antikörpermoleküle wie die Erythrozyten der Blutgruppe A_2. Bei Antikörperkonzentrationen, die nicht im Sättigungsbereich lagen,

hatten A_1-Erythrozyten die 3- bzw. 4-fache Zahl von Anti-A-Molekülen gebunden.

Diese Befunde sprechen dafür, daß die Verfasser, die eine größere Differenz als 2:1 angeben, nicht mit Antikörperkonzentrationen arbeiteten, die in der Lage waren, alle antigenen Bindungsstellen abzusättigen, was von GREENBURY und CARTRON (14,53) auch eingeräumt wird.

Dies kann auch erklären, weshalb für die absolute Zahl der antigenen Bindungsstellen pro Erythrozyt aller vier untersuchten Blutgruppen in dieser Untersuchung durchweg höhere Werte errechnet wurden. Daß die Differenz zu den bisher vorliegenden quantitativen Berechnungen besonders deutlich bei Erythrozyten der Blutgruppe A_2 zutage tritt, ist wohl dadurch zu erklären, daß einerseits die Antikörper von A_2-Erythrozyten schneller abdissoziieren, andererseits die Affinität der Antikörper zu A_2-Erythrozyten geringer als zu A_1- oder A_1B-Erythrozyten ist, wie ECONOMIDOU und Mitarbeiter aufgrund ihrer Untersuchungen über Gleichgewichts- und Dissoziationskonstante der Antigen-Antikörper-Reaktion feststellten (56). Es scheint verständlich, daß sich diese Unterschiede besonders im Bereich eines unzureichenden Antikörperangebotes auswirken.

Bei der Frage, ob man überhaupt von einer absoluten Anzahl von antigenen Bindungsstellen/Ery sprechen kann, muß allerdings folgendes berücksichtigt werden:
Der Antikörper, ein Immunglobulin G, ist bivalent und kann sich möglicherweise mit zwei antigenen Determinanten auf der Erythrozytenmembran verbinden.
Deshalb wird die Anzahl der antigenen Bindungsstellen auf Erythrozyten möglicherweise unterschätzt, wie GREENBURY und ECONOMIDOU in ihren Arbeiten zu bedenken geben und was auch für die Angaben in dieser Untersuchung Gültigkeit besitzt.

Bei sehr hohen Antikörperkonzentrationen, wie sie im Sättigungsbereich vorliegen, schätzen ECONOMIDOU und Mitarbeiter die Chance, daß sich ein Antikörpermolekül mit zwei antigenen Gruppen verbindet, allerdings gering ein. Eine zweite Möglichkeit, nämlich, daß sich der bivalente Antikörper mit je einer Seite an zwei benachbart liegende Erythrozyten bindet, könnte besonders bei der Technik des Radioimmunoassay eine Rolle spielen, bei der die Antikörperbindung an eine große Zellzahl gemessen wird und auch eine Agglutination eintreten kann (14). Da aber bei der quantitativen Immunautoradiographie einzelne Zellen gemessen werden, kann diese Möglichkeit hier ausgeschlossen werden, was möglicherweise eine weitere Erklärung dafür darstellt, daß in dieser Arbeit eine größere Anzahl antigener Bindungsstellen ermittelt wurde.

Die Ausprägung des Antigens A bei Individuen desselben Phänotyps ist nicht einheitlich, wie in Abb. 19 für die Blutgruppe A_1 gezeigt werden konnte.
Die niedrigste Anzahl an durchschnittlich gebundenen Anti-A-Molekülen betrug in dieser Untersuchung für diese Blutgruppe 1 030 000 Anti-A-Moleküle/Ery. Mit 1 900 000 hatten die Erythrozyten des A_1-Spenders mit der höchsten Antigendichte fast die doppelte Antikörpermenge gebunden. Eine ähnliche Streuung der Antigendichte innerhalb eines Spenderkollektivs desselben Phänotyps war bei den Blutgruppen A_1B (850 000 bis 1 100 000) und A_2 (460 000 bis 760 000) ermittelt worden. Unter acht Blutproben von A_1-Neugeborenen (210 000 bis 520 000) war die Antigendichte ebenfalls nicht einheitlich.
Diese Befunde bestätigen bisherige Untersuchungen, in denen ebenfalls unterschiedliche Antigendichten bei verschiedenen Spendern festgestellt worden waren (6,7,14 39,53).

Für die Möglichkeit einer Unterteilung der A_1-Blutproben in "stark", "mittel" und "schwach", wie sie COHEN/ZUELZER aufgrund ihrer Untersuchung von 42 A_1-Blutproben mit der Immunfluoreszenz vornahmen, konnten durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung keine Anhaltspunkte gefunden werden. Der Grund dafür liegt sicherlich in der von diesen Autoren angewandten Technik, die keine absoluten Quantifizierungen erlaubt, sondern es erforderlich macht, die Intensität der Fluoreszenz eines jeden Erythrozyten in Klassen von 0 bis 4 einzuteilen, wodurch eine feinere graduelle Unterscheidung nicht möglich ist.
Auch in anderen Blutgruppensystemen, wie dem Rh-System (57,58) und dem Kell-System (59), waren von Spender zu Spender unterschiedliche Antigendichten ermittelt worden. Auch in diesen Untersuchungen war der Höchstwert jeweils etwa doppelt so hoch wie der niedrigste Wert.

Neben der unterschiedlichen Antigenausprägung innerhalb eines Spenderkollektivs derselben Blutgruppe besitzt die Frage, wie sich die Antigendichten auf Erythrozyten innerhalb der Zellpopulation eines Spenders darstellen, sicherlich die größere Bedeutung.

Mit der bisher zur Quantifizierung von Membranantigenen am häufigsten verwendeten Technik, dem Radioimmunoassay, konnten ebenso wie durch Agglutinationsversuche über die von Zelle zu Zelle unterschiedliche Antigenausprägung keine Aussagen gemacht werden. Wenn auch aus diesem Grund bisher nur wenige Untersuchungen hierzu vorliegen, so hatten doch einige Autoren große Unterschiede in der Antigenausprägung auf Erythrozyten desselben Spenders feststellen können.

So errechnete MATSUKURA für den am schwächsten mit Ferritinpartikeln markierten Erythrozyten 280 000 antigene Bindungsstellen, während der am stärksten markierte Erythrozyt desselben Spenders mit 1 070 000 beinahe viermal mehr Antikörpermoleküle gebunden hatte. Ein ähnliches Bild fand dieser Verfasser bei den Blutgruppen A_1B (min. 210 000, max. 860 000) und A_2 (min. 0, max. 170 000).

WILLIAMS und VOAK, die einen Durchschnittswert von 800 000 antigenen Bindungsstellen für A_1-Erythrozyten angeben, errechneten für die am stärksten markierte Zelle mit 4 600 000 gebundenen Lectinmolekülen ebenfalls einen weit höheren Wert, der, wie auch die Befunde von MATSUKURA, die heterogene Ausprägung des Blutgruppenantigens A auf Erythrozyten andeutet.

Die ausführlichsten Untersuchungen über die unterschiedliche Antigenausprägung innerhalb einer Zellpopulation führten bislang REYES et al. (47) durch. Diese Gruppe arbeitete mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern und wertete die Markierungsmuster elektronenmikroskopisch aus. Wenn diese Technik auch keine absoluten Quantifizierungen der Membranantigene erlaubte, so war sie doch in der Lage, die unterschiedliche Markierung einzelner Zellen zu vergleichen. Dieser Vergleich machte deutlich, daß die Zellpopulation jedes Spenders bezüglich der Antigendichte auffallend heterogen ist und ein kontinuierliches Spektrum von stark bis schwach bzw. nicht markierten Zellen darstellt.

Speziell die Ausprägung des Antigens A_1 untersuchten ROCHANT et al. (60) unter Verwendung des A_1-spezifischen Dolichos-biflorus-Lectins und eines Fluoresceinkonjugierten Antilectins vom Kaninchen. Auch diese

Autoren fanden verschiedene Zellpopulationen (strong bright, intermediate, pale fluorescence), wobei die Unterteilung in 3 Populationen lediglich eine Erfordernis der verwendeten Technik war.

Diese Angaben finden in den Ergebnissen dieser Untersuchung ihre volle Bestätigung. Darüberhinaus kann hier aufgrund der verwendeten Technik, nämlich der quantitativen mikrophotometrischen Immunautoradiographie, diese heterogene Ausprägung quantitativ erfaßt werden, wie anhand von 15 Beispielen verschiedener Phänotypen in Tab. 14 gezeigt wurde. Besonders anschaulich werden die unterschiedlichen Antigenausprägungen von jeweils 300 bis 1 000 Erythrozyten in den Histogrammen dieser Untersuchung graphisch dargestellt.

Diese von Zelle zu Zelle unterschiedliche Antigenausprägung ist, wie auch die bereits erwähnten Unterschiede innerhalb eines Spenderkollektivs, nicht für die Antigene des ABH-Systems spezifisch. In ihren Untersuchungen über die Ausprägung des Antigens D hatten REARDEN und MASOUREDIS (61) ebenfalls sehr unterschiedliche Antigendichten innerhalb einer Zellpopulation feststellen können.
Von den Befunden der oben erwähnten Untersuchungen weichen die Ergebnisse von FISCHER und STEGE (50), die Blutgruppe A_1 betreffend, ab. Zwar hatten diese Autoren mit der Immunfluoreszenztechnik bei A_2-Spendern und Neugeborenen der Blutgruppe A_1 ebenfalls eine unterschiedliche Antikörperbindungskapazität festgestellt, doch präsentierte sich der Phänotyp A_1 als einheitliche Population mit starker Fluoreszenz gleicher Intensität. Ob dieser von den übrigen Ergebnissen abweichende Befund in der verwendeten Technik seine Erklärung finden kann, sollte durch weitere Untersuchungen mit der Immunfluoreszenz geklärt werden. Es scheint möglich zu sein,

daß im Bereich einer hohen Intensität der Fluoreszenz gearbeitet wurde, sodaß bei den ohnehin stark markierten A_1-Erythrozyten die Schwankungen von Zelle zu Zelle für das Auge nicht mehr diskriminierbar waren.

Es ist bekannt, daß sich die im Blute zirkulierenden Erythrozyten als eine sehr heterogene Population erweisen, wenn man weitere Eigenschaften dieser Zellen untersucht, wie dies bezüglich Größe (43,62), Form (63), Dichte (64,65), Ladung (22,66,67), Agglutinierbarkeit (68,69,70), mechanischer Resistenz (71), Immunhämolyse (72) und weiterer biochemischer Eigenschaften (73) eingehend erfolgt ist.

Diese Unterschiede sind fast ausschließlich eng mit dem Alter des einzelnen Erythrozyten korreliert (74). Ob dieses Zellalter auch der Grund für die von Zelle zu Zelle unterschiedliche Antigenausprägung ist, wurde von ROCHANT und Mitarbeitern untersucht (60). Ihren Aussagen zufolge war nach der Trennung von A_1-Erythrozyten über einen Dichtegradienten kein unterschiedliches Bild der Fluoreszenz zwischen der retikulozytenreichen, leichteren und damit jüngeren Zellfraktion und der dichteren, älteren Zellfraktion festzustellen.
Auch REYES (75) ist der Meinung, daß die heterogene Antigenausprägung nicht auf das Zellalter zurückzuführen sei, vor allem auch, weil Untersuchungen von Proerythroblasten ebenfalls ein solches heterogenes Verteilungsmuster des Antigens erbracht hatten.

Daß die heterogene Markierung der Erythrozyten nach Inkubation mit ^{125}J-Anti-D zum Teil doch auf das Zellalter oder auf technische Gegebenheiten bei der Autoradiographie zurückzuführen sind, können REARDEN und

MASOUREDIS (76) nicht ausschließen. Ihre Versuche mit enzymbehandelten Erythrozyten zeigen jedoch auch, daß die variierende Markierung mindestens zum Teil immunologisch bedingt ist.

Wie gering der technisch bedingte Anteil an der unterschiedlichen Markierung der Erythrozyten in dieser Untersuchung war, zeigt der Vergleich der Markierungsdichte von enzymatisch radiojodinierten Erythrozyten mit den Testerythrozyten, die mittels Antigen-Antikörperreaktion markiert worden waren (Abb. 8).

Die Histogramme in Abb. 22 dieser Untersuchung zeigen deutlich, daß auch Erythrozytenpopulationen relativ einheitlicher Zelldichte bzw. einheitlichen Zellalters eine ähnlich heterogene Verteilung der Antigendichte aufweisen wie die Gesamtpopulation, was die Ergebnisse von ROCHANT et al. bestätigt.

Aufgrund der obengenannten und der vorliegenden Untersuchungen ist es offensichtlich, daß die von Zelle zu Zelle unterschiedliche Antigenausprägung nur zu einem geringen Teil durch technische Faktoren oder durch das unterschiedliche Zellalter bedingt ist. Es kann deshalb als gesichert gelten, daß die Gesamtheit der Erythrozyten eines Individuums durch viele verschiedene Populationen von Erythrozyten unterschiedlicher Antigendichte gebildet wird.

Die Untersuchung der absoluten Anzahl von antigenen Bindungsstellen auf Erythrozyten verschiedener Dichte (s. Kap. C,V.6.) hatte ergeben, daß die Zellen der weniger dichten Fraktion mehr Antikörpermoleküle gebunden hatten, als die dichteren Zellen. Die Differenz, die sich, den Fall der Polycythaemia-vera-Erythrozyten ausgenommen, zwischen 6,8 % und 16,3 % bewegte, kann

durch die unterschiedliche Zellgröße von jungen und älteren Erythrozyten erklärt werden. Wie bereits dargestellt wurde, wiesen die jüngeren Erythrozyten durchweg einen größeren Zelldurchmesser und damit auch eine größere Oberfläche auf. Die große Differenz von über 30 % im Falle der Erythrozyten eines Polycythaemia-vera-Patienten ist wohl dadurch zu erklären, daß bei diesem Krankheitsbild die Neuproduktion und damit der Anteil an jüngeren Zellen höher liegt als bei gesunden Normalpersonen.
Die Beobachtungen, daß ältere, dichtere Erythrozyten schneller agglutinieren, steht dazu nur scheinbar im Widerspruch, zumal die Autoren dieser Untersuchungen dafür übereinstimmend Unterschiede der Ladung der Zelloberfläche und nicht einen Unterschied bezüglich antigener Determinanten verantwortlich machen. Im Übrigen kann die tatsächliche Antigen d i c h t e, die das Agglutinationsverhalten der Erythrozyten beeinflußt, bei jungen und älteren Zellen durchaus gleich sein, auch wenn die jüngeren Erythrozyten, entsprechend ihrer größeren Zelloberfläche insgesamt mehr antigene Bindungsstellen aufweisen.

Weitaus weniger als die Erythrozyten von erwachsenen Spendern wurden bisher die Erythrozyten von Neugeborenen untersucht. Die Tatsache, daß Nabelschnurerythrozyten eine deutlich geringere Antigendichte aufweisen als die von Erwachsenen, konnte durch die Untersuchungen mit der quantitativen Immunautoradiographie bestätigt werden. Allerdings wurde auch hier wieder für alle Phänotypen eine höhere Anzahl der antigenen Bindungsstellen gemessen, wie der Vergleich mit den Angaben von ECONOMIDOU und MATSUKURA zeigt (Tab. 27).

Tab. 27 Schätzungen der Anzahl antigener Bindungsstellen für das Antigen A auf Erythrozyten von Neugeborenen (Nabelschnurblut) durch verschiedene Autoren.

PHÄNOTYP	A_1	A_1B	A_2	A_2B
ECONOMIDOU et al.(6)	310 000	220 000	140 000	-----[1]
MATSUKURA (39)	220 000	280 000	-----[1]	-----[1]
Eigene Untersuchungen	362 000	295 500	240 000	95 000

[1] keine Angaben

Tatsächlich ist die Antigen d i c h t e auf den Erythrozyten von Neugeborenen noch geringer als diese Angaben aussagen, da der Erythrozyt eines Neugeborenen mit einem Durchmesser von durchschnittlich 8,6 μ (41) erheblich größer ist als der von Erwachsenen, wofür derselbe Autor einen mittleren Durchmesser von 7,5 μ angibt.

Vergleicht man für jeden Phänotyp die A-Antigendichte auf Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten, so fällt auf, daß die Antigendichte in unterschiedlichem Ausmaß zunimmt (s. Abb. 10). Diese Zunahme ist bei Erythrozyten der Blutgruppe A_1, die auch die höchste Antigendichte der Erwachsenenerythrozyten aller 4 Phänotypen aufweisen, am deutlichsten ausgeprägt. A_1-Erythrozyten von Erwachsenen besitzen etwa viermal mehr antigene Bindungsstellen als Neugeborenenerythrozyten derselben Blutgruppe. Nur etwa die doppelte Antigendichte wurde bei Erwachsenenerythrozyten der Blutgruppe A_2B gemessen. Ähnliche phänotypabhängige Unterschiede findet man auch, wenn man die Schätzungen antigener Bindungsstellen auf Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten von ECONOMIDOU vergleicht (Tab. 28)

Tab. 28 Verhältnis der Anzahl antigener Bindungsstellen für das Antigen A (A_1 und A) auf Erythrozyten von Erwachsenen u. Neugeborenen

PHÄNOTYP	A_1	A_1B	A_2	A_2B
ECONOMIDOU et al.	3,7:1	2,8:1	1,9:1	-
Eigene Untersuchungen	3,8:1	3,2:1	2,6:1	2,3:1

Anscheinend nimmt die postnatale Ausprägung des Antigens A_1 stärker zu als die des Antigens A, welches auf den Erythrozyten aller vier Phänotypen zu finden ist.
Für diese Annahme sprechen auch die Untersuchungen der Blutgruppenantigene A und B auf fetalen Erythrozyten durch CONSTANDOULAKIS und Mitarbeiter (77,78). In diesen Untersuchungen konnte das Antigen A bereits auf Erythrozyten von 12 Wochen alten Foeten nachgewiesen werden, daneben aber wurde festgestellt, daß das Antigen A_1 selbst bei Foeten im Alter von 28 Wochen noch völlig fehlt.
Damit kann auch erklärt werden, daß es Neugeborene gibt, die zwar mit Sicherheit der Blutgruppe A zugeordnet werden können, die Bestimmung der Untergruppe aber zuweilen Schwierigkeiten bereitet.
Dieses späte Einsetzen der Ausbildung des Antigens A_1 ist vermutlich die Erklärung dafür, daß dieses Antigen dann postnatal relativ mehr zunimmt als das Antigen A.
Daß das Antigen A_1, daneben auch die Antigene P und H, beim Neugeborenen nur schwach ausgeprägt ist, wird auch von SPEISER (79) angegeben. Seine Aussage allerdings, daß die übrigen bekannten Systeme, also auch das Antigen A, bei Geburt bereits voll ausgeprägt seien, trifft mit Sicherheit nicht zu, da auch bei Phänotypen, die nur das Antigen A besitzen, eine Antigenzunahme nach der Geburt festzustellen war.

Seitdem die unterschiedliche Antigenausprägung auf Erythrozyten von Neugeborenen und Erwachsenen bekannt war, stieß die Frage, in welchem Lebensalter die maximale Antigenausprägung zu finden sei, auf reges Interesse.
Ausführliche Untersuchungen zu dieser Fragestellung wurden von THOMSEN und KETTEL,MORVILLE bzw. BJØRUM und KEMP bereits vor 50 Jahren, mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen, durchgeführt.

Der "Empfindlichkeitsgrad" der Rezeptoren wurde in diesen 3 Untersuchungen durch Agglutination der Erythrozyten ermittelt, zwischen den Untergruppen A_1 und A_2 wurde nicht unterschieden.
Während BJØRUM und KEMP (16) eine maximale Antigenausprägung im 20. - 30. Lebensjahr, THOMSEN und KETTEL (17) im 15. - 20. Lebensjahr ermittelten, stellte MORVILLE (15) fest, daß in den meisten Fällen der "Rezeptor" seine volle Stärke erreicht hat, wenn das Kind 4 Monate alt ist.
Nach den Angaben von LODENKÄMPER und STIENEN (19) erhalten die roten Blutkörperchen im Verlaufe des ersten Lebensjahres "ihre maximale Bindungseigenschaft". Ein ähnlich rapides Ansteigen der Antigenausprägung stellte GRUNDBACHER mittels Immunhämolyse der Erythrozyten durch ein Kaninchen-Anti-A fest: Einem schnellen Anstieg der Antigenstärke während der ersten 5 Lebensmonate folge ein weiteres langsameres Ansteigen, bis im Alter von 2 - 4 Jahren die Werte erreicht wären, die auch bei Erwachsenen gefunden würden (20).

Ebenso unterschiedlich wie die Angaben über die Entwicklung der Blutgruppenantigene nach der Geburt sind die Meinungen über das weitere Schicksal der Antigenausprägung.
LODENKÄMPER und STIENEN zufolge bleibt die Antigenausprägung, nachdem sie das Maximum erreicht hat, 30 bis 40 Jahre konstant, um dann kontinuierlich bis ins hohe Alter abzufallen und gegen Null zu streben. Nach THOMSEN und KETTEL dagegen, in deren Untersuchungsgut sich einige hundertjährige und noch ältere Personen befanden, sowie nach GRUNDBACHER bleibt die maximale Antigenausprägung allerdings bis ins hohe Alter erhalten.

In der vorliegenden Untersuchung konnte durch die Ermittlung der Anzahl antigener Bindungsstellen auf A_1-Erythrozyten von Kindern ab einem Alter von 9 Tagen festgestellt werden, daß nach einem steilen Anstieg in den ersten Lebensmonaten die maximale Antigendichte im Alter von etwa 3 Monaten erreicht ist. Eine Abnahme der Antigendichte mit zunehmendem Lebensalter konnte nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse bestätigen besonders die Befunde von MORVILLE, sind aber auch mit den Ergebnissen von GRUNDBACHER, und, was den Antigenanstieg betrifft, auch von LODENKÄMPER und STIENEN annäherungsweise in Einklang zu bringen. Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse von MORVILLE auf der einen Seite und BJØRUM/KEMP bzw. THOMSEN/KETTEL auf der anderen Seite sind wohl in den verschiedenen Modifikationen der angewandten Agglutinationstechnik zu suchen.

BJØRUM und KEMP hatten genau nach der von THOMSEN beschriebenen Technik gearbeitet und damit auch etwa die gleichen Ergebnisse erzielt. MORVILLE dagegen hat die eingetretene Agglutination mikroskopisch abgelesen und konnte dadurch feinere Unterschiede in der Agglutination erkennen.

Ob man mit einer Agglutinationstechnik die Zunahme der antigenen Bindungsstellen und den Zeitpunkt ihrer maximalen Ausprägung allerdings überhaupt exakt erfassen kann, scheint sehr fraglich, da zum Zeitpunkt der Agglutination nur ein Bruchteil der antigenen Determinanten mit Antikörpern besetzt ist, wie in Kap. III. dargestellt wurde.

Die Tatsache, daß der Antigenanstieg zumeist später beobachtet wurde und weniger steil war, hängt wohl auch noch damit zusammen, daß keine Unterscheidung zwischen den Untergruppen A_1 und A_2 getroffen wurde, wie dies bei den Untersuchungen von LODENKÄMPER/STIENEN, BJØRUM/KEMP und THOMSEN/KETTEL der Fall war. Dadurch überlappte sich

der steilere postnatale Anstieg des Antigens A_1 mit dem relativ geringeren Anstieg des Antigens A. Bisher hatte nur GRUNDBACHER zwischen den Untergruppen unterschieden und wie auch MORVILLE den steilsten Anstieg in den ersten Lebensmonaten gefunden.

An einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der Antigenausprägung und Leukämie dachte zum ersten Mal v. LOGHEM (80) im Jahre 1957, als er einen Fall von akuter Myeloblastenleukämie beschrieb, bei dem die Erythrozyten des Patienten teilweise sehr schwache Agglutination nach Inkubation mit Anti-A-Antikörpern zeigten. Vor dem Auftreten der Erkrankung war dieser Patient ohne Schwierigkeiten der Blutgruppe A zuzuordnen gewesen.
Ein Jahr zuvor hatte WIENER (81) einen Fall von chronischer myeloischer Leukämie beschrieben, bei dem das Antigen A auf Erythrozyten durch Agglutination nicht nachweisbar war. In einem zusammenfassenden Bericht sind bei GOLD (21) 17 weitere Publikationen bis 1963 zusammengestellt, die Veränderungen der Blutgruppenantigene im Zusammenhang mit leukämischen Erkrankungen beschreiben.

Die anfängliche Meinung, daß Antigenveränderungen lediglich bei Leukämien anzutreffen seien, mußte bald verlassen werden, da solche Veränderungen auch bei aplastischer Anämie (82), Polycythaemia vera (83), Erythroleukämie (84,85) und M.Hodgkin (86) beschrieben wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Patienten mit aplastischer Anämie und Polycythaemia vera untersucht. Hierbei fand sich eine deutlich verminderte Antigendichte bei aplastischer Anämie, während bei Polycythaemia vera in 4 Fällen eine Verminderung der mittleren Antigenausprägung/Erythrozyt vorlag, in zwei Fällen aber die Antigenausprägung im Normalbereich lag.

Zunächst hatte man gedacht, daß innerhalb des ABO-Systems nur das Antigen A sich ändern könne, umsomehr als in einem von DUNSFORD (zit. b. Hoogstraaten,87) mitgeteilten Fall bei einem Patienten der Blutgruppe AB anscheinend selektiv nur das Antigen A betroffen war. Doch weitere Beobachtungen ergaben, daß auch die Antigene B (88,89), H (90,91,92), MN (92), Ii (91), D, E (90,92) und Le^a (92) verändert sein können.

Die beschriebenen Antigenveränderungen sind völlig uneinheitlich und können sich wie folgt darstellen:

1. Die Veränderungen betreffen nur ein oder auch mehrere Blutgruppensysteme.
2. Ist nur ein System betroffen, können von zwei Antigenen (z.B. AB) beide oder nur eines verändert sein.
3. Eine lediglich quantitative Verminderung der Antigendichte;
4. Eine totale qualitative Veränderung des Antigentypus (z.B. A → 0).
5. Die Veränderungen betreffen alle Erythrozyten oder nur einen Teil derselben (Mosaik, Chimäre).
6. Die Antigenveränderungen fluktuieren während des Krankheitsverlaufes.

Das Vorhandensein von mehreren, meist zwei, verschiedenen Zellpopulationen im Patientenblut wird sehr häufig beschrieben (83,84,85,93,94,95,96,97,98).
Bei weitaus den meisten Untersuchungen wurde der Typ der "Chimäre" oder des "Mosaiks" dadurch festgestellt, daß ein Teil der Erythrozyten nach der Inkubation mit dem Antikörper nicht agglutiniert wurde. Die Berechtigung, aus dieser Tatsache zu schließen, daß wirklich zwei verschiedene Zellpopulationen vorlagen, muß allerdings angezweifelt werden. Die Feststellung, ob Erythrozyten agglutiniert werden oder nicht, läßt nur bedingt einen Schluß auf die tatsächliche Antigendichte auf der Zellmembran zu.
In dieser Untersuchung war gezeigt worden (Kap.C,III.), daß A_1-Erythrozyten im agglutinierenden Bereich lediglich 230 000 Anti-A-Moleküle gebunden hatten, im Bereich der Absättigung aller antigenen Bindungsstellen dagegen 1 300 000. Bei dem als zweite Population angesprochenen Teil der Erythrozyten braucht also nur die für die Agglutination erforderliche Antigendichte unterschritten worden sein, was aber nicht dahingehend interpretiert werden darf, daß sie das Antigen überhaupt nicht besitzen. Auch in dieser Untersuchung war bei der zur Blutgruppenbestimmung durchgeführten Agglutination bei Leukämiepatienten häufig festgestellt worden, daß die Erythrozyten nur teilweise agglutiniert waren. Die Untersuchung der Erythrozyten von 45 Patienten mit der quantitativen Immunautoradiographie zeigte jedoch, daß tatsächlich nur in einem Fall wirklicher Chimärismus vorlag (Kap. C,2.d.). In allen übrigen Fällen, in denen die Antigendichte vermindert war, fand sich ein kontinuierliches Spektrum der Antigenausprägung. Für die Annahme, daß das Vorkommen von völlig verschiedenen Zellpopulationen viel seltener ist als bisher vermutet, sprechen auch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von POSCHMANN et al. (98), die unter 67 akuten lymphatischen Leukämien keinen Fall von Chimärismus und bei 5 untersuchten Fällen von juveniler, chronischer myeloischer Leukämie nur einen Fall von Chimärismus fanden.

Einen Überblick darüber, welcher Prozentsatz der Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen Alterationen der Antigenausprägung aufweist, konnte erst durch Untersuchungen einer größeren Patientenzahl gewonnen werden.
AYRES et al. (99) untersuchten 51 Leukämiepatienten verschiedener Blutgruppen und fanden in 9 Fällen (17,6 %) verminderte Antigendichten.
POSCHMANN et al. (98) geben bei der Untersuchung von 67 Kindern mit ALL in 28,3 % der Fälle leichte Veränderungen der ABH-Rezeptoren an. Unter 3 Fällen von AML fanden dieselben Autoren zweimal veränderte Antigendichten, alle 5 untersuchten jCML-Patienten zeigten eine stark verminderte Ausprägung der Blutgruppenantigene.
In den Untersuchungen von ROCHANT et al. (60) wiesen 46 % der untersuchten Patienten mit hämatologischen Erkrankungen eine Verminderung des A_1-Antigens auf, wobei der Prozentsatz bei den Patienten mit aplastischer und refraktärer Anämie mit 81 % Veränderungen am Höchsten war. In der Gruppe der akuten Leukämie waren die A_1-Antigendichten in 56 % der Fälle vermindert.
Von den 45 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen der vorliegenden Untersuchung hatten 59 % verminderte Antigendichten. Auch hier war, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ROCHANT, der Prozentsatz in der Gruppe der aplastischen Anämien am höchsten. Für alle 4 untersuchten Patienten wurden deutlich erniedrigte Antigendichten ermittelt.
In welchem quantitativen Ausmaß die Antigendichten bei leukämischen Erkrankungen vermindert sind, konnte mit den bisher eingesetzten Techniken nicht absolut errechnet werden. So gibt diese Untersuchung erstmals einen Überblick über die reelle Verminderung der Antigenausprägung. Die ermittelten Werte der Antigendichten für die einzelnen Patienten wurden in den Tabellen 16 bis 20 dargestellt.

Durchschnittlich banden die Erythrozyten der Patienten mit verminderter Antigenausprägung etwa die Hälfte der Antikörpermoleküle, die die Erythrozyten von Normalpersonen oder Patienten ohne Antigenverminderung gebunden hatten. Die Verminderung der Antigendichte war bei akuter lymphatischer Leukämie (738 000), chronischer lymphatischer Leukämie (714 000), myeloischer Leukämie (810 000) und Polycythaemia vera (795 000) im Durchschnitt sehr ähnlich, was aber nicht darüber hinwegtäuschen darf, daß auch die Gruppe der antigenverminderten Patienten große individuelle Unterschiede in der Antigendichte aufwies. Für die Gruppe der aplastischen Anämien wurde die deutlichste Antigenreduzierung festgestellt (572 000). Der absolut niedrigste Wert für einen A_1-Spender mit 350 000 gebundenen Anti-A-Molekülen fand sich bei einem Patienten mit aplastischer Anämie.

Bei der Suche nach möglichen Ursachen für die Änderungen der Antigenausprägung im Verlaufe von hämatologischen Erkrankungen wird nicht selten die Frage nach dem Einfluß der Behandlung dieser Patienten mit Zytostatica oder Bestrahlung gestellt. Es liegen jedoch zahlreiche Hinweise vor, daß zwischen zytostatischer Therapie und/oder Bestrahlung und verminderter Antigenausprägung kein ursächlicher Zusammenhang besteht.
POSCHMANN et al. (98), deren 67 ALL-Patienten zum Teil behandelt und zum Teil unbehandelt waren, konnten diesbezüglich keine Korrelation feststellen.
Bei zahlreichen weiteren Fällen waren veränderte Antigendichten gefunden worden, bevor die Therapie begann(87,94,97).
In der Untersuchung von ROCHANT et al. (60) waren in der Patientengruppe der myelo- und lymphoproliferativen Erkrankungen mit Antigenverminderung 10 unbehandelte und 13 behandelte Patienten.

Ein Zusammenhang zwischen Therapie und Antigenverminderung kann auch aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung nicht hergestellt werden. Die Antigendichten von 18 behandelten ALL-Patienten sind in 9 Fällen in der Größenordnung der Normalpersonen und in 9 Fällen vermindert. Auch bei den weniger unbehandelten Patienten waren sowohl normale wie auch verminderte Antigendichten festzustellen.

Wodurch Antigenmodifikationen im Zusammenhang mit Leukämie verursacht werden, konnte bislang nicht geklärt werden. Die theoretische Möglichkeit, daß ein von leukämischen weißen Blutzellen produziertes Enzym die Antigeneigenschaften verändern könne, wurde durch die Untersuchungen von RENTON (100) ausgeschlossen, der zeigen konnte, daß die einem Leukämiepatienten transfundierten Erythrozyten in ihren Antigeneigenschaften unverändert blieben.
Daß es sich bei den Erythrozyten mit veränderten Antigeneigenschaften lediglich um unreife Erythrozyten handeln könne, erscheint unwahrscheinlich.
SALMON (96) hatte in Populationen von veränderten sowie unveränderten Erythrozyten die gleichen Retikulozytenzahlen ermittelt und STRATTON (zit. b. Hoogstraaten,87) wies nach, daß bei den erythrozytären Vorläuferzellen im Knochenmark das A Antigen ebenso wie bei den reifen Erythrozyten des peripheren Blutes fehlte.

In allgemeiner Übereinstimmung wird heute ein Defekt in der biochemischen Synthese der Blutgruppensubstanzen diskutiert. Die Vorstellungen gehen dahin, die Blutgruppenantigenveränderungen durch einen Enzymdefekt zu erklären. Die Blutgruppendeterminanten für die Blutgruppe A, N-acetyl-galactosamin (GALNAc), können bei einem Mangel des sie umsetzenden Enzyms, der GALNAc-Transferase, alteriert sein. Tatsächlich fand SALMON (91) bei zwei Leukämiepatienten mit verminderter A-Antigenausprägung eine signifikant niedrigere GALNAc-Transferase-Aktivität.

Bereits 1969 hatten SCHENKEL-BRUNNER und TUPPY (101) in vitro mit Hilfe der GALNAc-Transferase O-Erythrozyten in solche der Blutgruppe A umwandeln können. Diese Umwandlung war mit einem Verlust des H-Antigen-Gehaltes der O-Erythrozyten einhergegangen.
Es sind jedoch auch Fälle bekannt, bei denen sowohl die A-Antigene als auch die H-Antigene der Erythrozyten vermindert waren (21). Es ist deshalb auch möglich, daß nicht nur eine Blockierung der Umwandlung von H-Substanz, sondern auch eine Blockierung der Umwandlung des Vorläuferglykoproteins in H-Substanz vorliegen kann.

Die Diskussion, auf welcher zellulären Ebene sich diese Enzymstörungen abspielen, ist noch nicht abgeschlossen. Nach RENTON (102) können diese Veränderungen Stammzellen betreffen, die einerseits Erythrozyten mit Antigendefekten und andererseits leukämische weiße Blutzellen bilden.

Nachdem bei einigen Untersuchungen zusammen mit einer Verminderung der Antigenausprägung ein erhöhter HbF-Gehalt der Erythrozyten festgestellt worden war (84,86), wurden in jüngster Vergangenheit Untersuchungen an Erythrozyten von Leukämiepatienten durchgeführt, die andere Parameter als die Blutgruppenantigenausprägung zum Gegenstand hatten. Leider blieb dabei in vielen Fällen die Frage der Antigenausprägung unberücksichtigt, so bei den Untersuchungen von SHERIDAN (103) über das Muster der HbF-Produktion bei Leukämiepatienten. Auch DOVER, der neben der HbF-Bildung bei einer jCML sieben verschiedene Enzyme der Erythrozyten untersuchte (104), sowie ADAMSON et al. in ihrer Untersuchung der G-6-PD bei Polycythaemia-vera-Patienten (105) geben keine Auskunft darüber, ob in diesen Fällen gleichzeitig eine Modifikation der Antigenausprägung vorhanden war.

Die charakteristischen Ergebnisse dieser Arbeiten, nämlich HbF- und Enzymmuster wie sie auch bei Nabelschnurerythrozyten gefunden werden, legen jedoch die Vermutung nahe, daß in diesen Fällen auch mit verminderter Antigenausprägung zu rechnen gewesen wäre. Auch POSCHMANN et al. (98) hatten in allen 5 Fällen von jCML mit verminderter Antigenausprägung eine erhöhte Zahl von Zellen mit HbF-Produktion nachgewiesen.

Zur Beantwortung der Frage, auf welcher zellulären Differenzierungsstufe der erythrozytären Vorläuferzelle die Weichen für die unterschiedliche HbF-Produktion (und auch wahrscheinlich Antigenausprägung) gestellt werden, hat PAPAYANNOPOULOU 1977 ein interessantes Modell der stammzelldifferenzierungsabhängigen Regulation der HbF-Synthese entwickelt (106). Danach durchläuft die pluripotente Stammzelle mehrere Differenzierungsstufen, bis es in der Perinatalperiode zu einem switch-over kommt und die HbA-Produktion einsetzt. Der steile postnatale Anstieg der Blutgruppenantigendichte (Kap.C,V.1.6.) läßt an einen ähnlichen switch-over-Mechanismus denken, der eventuell mit der Umstellung auf die HbA-Produktion zusammenhängen mag.
Die bei den verschiedenen hämatologischen Erkrankungen gefundenen Veränderungen des HbF-Musters und der Antigenausprägung lassen an eine Störung bzw. Blockierung dieser Differenzierungsvorgänge auf früher Stammzellebene denken.

Auch bei gesunden erwachsenen Normalpersonen werden stets, wenn auch in geringer Zahl, Zellen gefunden, die HbF aufweisen (51,107,108). Die Ursache allerdings, warum bei leukämischen Erkrankungen HbF-produzierende Stammzellen sich dem switch-over entziehen und proliferieren, ist bis heute ungeklärt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Methode der quantitativen Immunautoradiographie wurden unter Verwendung von ^{125}J-markierten heterologen Antikörpern die Erythrozyten von insgesamt 106 Spendern auf die quantitative Ausprägung des Blutgruppenantigens A untersucht.

Die Untersuchungen wurden mit Erythrozyten durchgeführt, die mit einer 0,25 %-igen Glutaraldehydlösung fixiert worden waren. Es wurde gezeigt, daß die Zellen dabei ihre Fähigkeit behalten, spezifisch Antikörper zu binden. Im Zeitraum von 16 Monaten wurde keine Veränderung der Membranantigene einmal fixierter Zellen beobachtet. Wegen der fixationsbedingten, unspezifischen Proteinbindung wurden O-Erythrozyten als Kontrollzellen verwendet, um die zwischen 5 und 10 % liegende unspezifische Bindung kalkulieren zu können.

A_1-Erythrozyten erwachsener Normalpersonen banden mit $1{,}34 \times 10^6$ durchschnittlich etwa doppelt so viele Anti- A-Moleküle wie A_2-Erythrozyten, für die ein Durchschnittswert von $0{,}64 \times 10^6$ antigenen Bindungsstellen errechnet wurde. Für Erythrozyten von erwachsenen A_1B- bzw. A_2B-Normalpersonen wurden $0{,}94 \times 10^6$ bzw. $0{,}23 \times 10^6$ Bindungsstellen für das Antigen A ermittelt.

Die Antigendichte auf Erythrozyten von Neugeborenen war mit $0{,}36 \times 10^6$ für A_1-, $0{,}30 \times 10^6$ für A_1B-, $0{,}24 \times 10^6$ für A_2- und $0{,}09 \times 10^6$ für A_2B-Erythrozyten wesentlich geringer.

Die Untersuchung der Antigenausprägung auf A_1-Erythrozyten von Spendern im Alter von 9 Tagen bis 95 Jahren ergab, daß etwa gegen Ende des dritten Lebensmonates die maximale Antigendichte erreicht ist, die bis ins hohe Alter konstant bleibt.

Die Erythrozyten von 59 % der Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wiesen eine Verminderung der Anzahl antigener Bindungsstellen auf, die in der Gruppe der aplastischen Anämien am deutlichsten ausgeprägt war.

Bei den Erythrozyten eines Patienten mit einer akuten, unklassifizierten Leukämie konnten zwei unterschiedliche Zellpopulationen beobachtet werden; während bei 44 % der Zellen die Antigendichte deutlich verringert war, konnte auf der zweiten Zellpopulation das Antigen A überhaupt nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung eines Falles von natürlichem Chimärismus machte das Vorhandensein von 88 % 0-Erythrozyten und 12 % A_1-Erythrozyten deutlich. Mit $1{,}45 \times 10^6$ gebundenen Anti-A-Molekülen wiesen die A_1-Erythrozyten eine für diesen Phänotyp normale Antigendichte auf.

Die Untersuchung der Verteilung bestimmter Antigendichten in der Erythrozytenpopulation eines Spenders ergab, daß die Gesamtpopulation der Erythrozyten sehr heterogen ist und sich die verschiedenen Antigendichten in weiten Grenzen um den Mittelwert gruppieren.
Durch Messung der Silberkorndichten über enzymatisch radiojodinierten Standarderythrozyten und immunologisch markierten Erythrozyten unterschiedlichen Alters konnte gezeigt werden, daß diese Variationsbreite nur in geringem Maß meßtechnisch bedingt ist oder im Zusammenhang mit dem Zellalter steht.

Die Antigenausprägung bei verschiedenen Spendern desselben Phänotyps variierte ebenfalls erheblich. Die höchste Zahl antigener Bindungsstellen in der Gruppe der A_1-Spender betrug mit $1{,}9 \times 10^6$ fast das Doppelte des niedrigsten Wertes mit $1{,}0 \times 10^6$ antigenen Bindungsstellen.

Nach der Auftrennung der gesamten Erythrozytenpopulation in zwei Fraktionen mit weniger dichten, jüngeren bzw. dichteren, älteren Zellen wurde festgestellt, daß die jüngeren Zellen mehr Anti-A-Moleküle banden als die älteren. Es wurde versucht, dies mit der größeren Zelloberfläche der jüngeren Erythrozyten zu erklären.

Ein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht des Spenders und der Ausprägung des Antigens A konnte weder bei Normalpersonen noch bei Leukämiepatienten festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden mit bisher vorliegenden Ergebnissen, die mit anderen Techniken erzielt wurden, verglichen und mögliche Ursachen für deren Unterschiedlichkeit diskutiert.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. BOROVICZENY,K.-G.v., SCHIPPERGES,H. und SEIDLER,E.
Einführung in die Geschichte der Hämatologie
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 1974

2. HIRSZFELD,L.
Probleme der Blutgruppenforschung
VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1960

3. RACE,R.R. and SANGER,R.
Blood Groups in Man, 6th edition
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975

4. DAVIDSOHN,I. and STEJSKAL,R.
Tissue Antigens A,B and H in Health and Disease
Haematologia 6, 177, 1972

5. BOYD,W.C., BHATIA,H.M., DIAMOND,M.A. and MATSUBARA,S.
Quantitative Study of the Combination of Lima Bean Lectin with Human Erythrocytes
J.Immunol., 89, 463, 1962

6. ECONOMIDOU,J., HUGHES-JONES,N.C. and GARDNER,B.
Quantitative Measurements Concerning A and B Antigen Sites
Vox Sang., 12, 321, 1967

7. COHEN,F. and ZUELZER,W.W.
Interrelationship of the Various Subgroups of the Blood Group A: Study with Immunofluorescence
Transfusion, 5, 223, 1965

8. WIENER,A.S. and SOCHA,W.W.
Macro- and Microdifference in Blood Group Antigens and Antibodies
Int.Arch.Allergy, 47, 946, 1974

9. WATKINS,W.M. and MORGAN,W.T.J.
The A and H Character of the Blood Group Substances Secreted by Persons Belonging to Group A_2
Acta Genet.Statist.Med., 6, 521, 1956

10. GRUNDBACHER,F.J.
Sources of Quantitative Variation of the Human A Antigen of Erythrocytes
Amer.J.hum.Genet., 17, 399, 1965

11. PRODANOV,P.
Etude Quantitative du Système de Groupes Sanguins ABO.
I. Etudes Quantitative des Antigènes A_1,A_i,A_2,B Normaux et des Types d'Interaction entre Eux
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 10, 19, 1970

12. JUEL,E.
Studies in the Subgroups of the Blood Group A
Absorption Experiments Indicating Qualitative Differences between Subgroups A_1 and A_2
Acta path.microbiol.scand., 46, 251, 1959

13. MORENO,C. LUNDBLAD,A and KABAT,E.A.
Immunochemical Studies on Blood Groups
II. A Comparative Study of the Reaction of A_1 and A_2 Blood Group Glycoproteins with Human Anti-A
J.exp.Med. 134, 439, 1971

14. GREENBURY,C.L., MOORE,D.H. and NUNN,L.A.C.
Reaction of 7 S and 19 S Components of Immune Rabbit Antisera with Human Group A and AB Red Cells
Immunology 6, 421, 1963

15. MORVILLE,P.
Investigations on Isohemagglutination in Mothers and New-born Children.
The Development of the Blood Characteristics during the 1^{st} Year of Life
Acta path.microbiol.Scand. 6, 218,1929

16. BJØRUM,A. und KEMP,T.
Untersuchungen über den Empfindlichkeitsgrad der Blutkörperchen gegenüber Isoagglutininen im Kindesalter
Acta path.microbiol.Scand. 6, 218,1929

17. THOMSEN,O. und KETTEL,K.
Die Stärke der menschlichen Isoagglutinine und entsprechenden Blutkörperchenrezeptoren in verschiedenen Lebensaltern
Z. Immun.-Forsch. 63, 67, 1929

18. WITEBSKY,E. and ENGASSER,L.M.
Blood Groups and Subgroups of the New-born
I. The A-Factor of the New-born
J. Immunol. 61, 171, 1949

19. LODENKÄMPER,H. und STIENEN,G.
Über die Bindungsfähigkeit der roten Blutkörperchen für die Isoagglutinine in den einzelnen Lebensabschnitten
Ärztl. Wschr. 8, 110, 1953

20. GRUNDBACHER,F.J.
Changes in the Human A Antigen of Erythrocytes with the Individuals Age
Nature, 204, 192, 1964

21. GOLD,E.R. und HOLLANDER,L.
Blutgruppen und Leukämie
Blut 9, 188, 1963

22. SKUTELSKY,E., MARIKOVSKY,Y. and DANON,D.
Immunoferitin Analysis of Membrane Antigen Density:
A. Young and Old Human Blood Cells
B. Developing Erythroid Cells and Extruded Erythroid Nuclei
Europ. J. Immunol. 4, 512, 1974

23. BIRD,G.W.G.
Mixtures, Mosaics and Modifications
Rev.franç.Transfus.Immunohémat. 19, 247, 1976

24. THIEL,E., DÖRMER,P., RODT,H. and THIERFELDER,S.
Quantitative Immunautoradiography at the Cellular Level. I. Design of a Microphotometric Method to Quantitative Membrane Antigens on Single Cells Using ^{125}I-labeled Antibodies
J.immunol.Meth. 6, 317, 1975

25. THIEL,E., DÖRMER,P., RUFFELT,W. and THIERFELDER,S.
Quantitative Immunautoradiography at the Cellular Level. II. Absolute Measurements Using Labeled Standard Cells as a Source of Reference
J.immunol.Meth. 12, 237, 1976

26. RENTON,P.H. and HANCOCK,J.
A Simple Method of Separating Erythrocytes of Different Ages
Vox Sang. 9, 183, 1964

27. MORRISON,M.
Jodination Reactions Catalyzed by Lactoperoxidase
Gunma Symp.Endocrin. 5, 239, 1968

28. MARCHALONIS,J.J.
An Enzymatic Method for the Trace Iodination of Immunoglobulins and Other Proteins
Biochem.J. 113, 299, 1969

29. HUNTER,W.M. and GREENWOOD,F.C.
Preparation of Iodine - 131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity
Nature 194, 495, 1962

30. McCONAHEY,P.J. and DIXON,F.J.
A Method of Trace Iodination of Proteins for Immunologic Studies
Int.Arch.Allergy 29, 185, 1966

31. SHUMAK,K.H., BATCHELOR,J.R. and WATTS,H.G.
^{125}I-labeled Rat Transplantation Alloantibody
Transplantation 15, 70, 1973

32. BOGDANOVE,E.M. and STRASH,A.M.
Radioiodine Escape is an Unexpected Source of Radioimmunoassay Error and Chronic Low Level Environmental Contamination
Nature 257, 426, 1975

33. DÖRMER,P. und BRINKMANN,W.
Quantitative ^{14}C-Autoradiographie einzelner Zellen
Histochemie 29, 248, 1972

34. SCHMID,W.
Autoradiography of Human Chromosomes
In: Yunis,J.J. (Hrgb.)
Human Chromosome Methodology
Academic Press, New York-London, 1965

35. DÖRMER,P.
Photometric Methods in Quantitative Autoradiography
In: Lüttge,U. (Hrgb.)
Microautoradiography and Electron Probe Analysis: Their Application to Plant Physiology
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972

36. THIEL,E., DÖRMER,P. and EULITZ,M.
Quantitative ^{125}J-Autoradiographie einzelner Zellen
Histochemistry 43, 33, 1975

37. HARPAZ,N., FLOWERS,H.M. and SHARON,N.
Studies on B-antigenic Sites of Human Erythrocytes by Use of Coffee Bean A-Galactosidase
Arch.Biochem.Biophys. 170, 676, 1975

38. WILLIAMS,M.A. and VOAK,D.
Studies with Ferritin-labelled Dolichos biflorus Lectin on the Numbers and Distribution of A Sites on A_1 and A_2 Erythrocytes, and on the Nature of its Specifity and Enhancement by Enzymes
Brit.J.Haematol. 23, 427, 1972

39. MATSUKURA,Y.
Demonstration of Ferritin-Labelled Antibodies Bound to Human Erythrocytes fixed with Glutaraldehyde
Vox Sang. 22, 549, 1972

40. v.GASTEL,C. and de WIT,C.D.
The Effect of Red Cell Age on its Agglutinability by Anti-A-Serum
Vox Sang. 19, 105, 1970

41. WINTROBE,M.M.
Clinical Hematology, 3rd ed., 95
Philadelphia, 1952

42. MATSUKURA,Y.
Electron Microscopic Observations on the H Antigen Sites of Human Erythrocytes Using Ferritin Antibody Conjugates
Vox Sang. 31, 321, 1976

43. WESTERMANN,M.P., PIERCE,L.E. and JENSEN,W.N.
Erythrocytes Lipids: A Comparison of Normal Young and Normal Old Populations
J.Lab.Clin.Med. 62, 394, 1963

44. MASOUREDIS,S.P., SUDORA,E.J., MAHAN,L. and VICTORIA,E.J.
Antigen Site Densities and Ultrastructural Distribution Patterns of Red Cell Rh Antigens
Transfusion 16, 94, 1976

45. PONDER,E.
Hemalysis and Related Phenomena
Grune and Stratton, New York, 1948

46. REYES,F., LEJONC,J.L., GOURDIN,M.F., HOI TONTHAT,M. et GORIUS,J.B.
Immuno-Hématologie. Détection de l'Antigène A Erythrocytaire en Microscopie Electronique
C.R.Acad.Sc. Paris 277, 1829, 1973

47. REYES,F., GOURDIN,M.F., LEJONC,J.L., CARTRON,J.P., GORIUS,J.B. and DREYFUS,B.
The Heterogenity of Erythrocyte Antigen Distribution in Human Normal Phenotypes: An Immunoelectron Microscopy Study
Brit.J.Haematol. 34, 613, 1976

48. BESSIS,M. et BOISFLEURY,A.de
Etude des Differentes Etapes de l'Erythro-phagocytose par Microcinématographie et Microscopie Electronique a Balayage
Nouv.Rev.Franc.d'Hémat. 10, 223, 1970

49. GOURDIN,M.F., REYES,F., LEJONC,J.L., BRETON-GORIUS,J., MANNONI,P. et DREYFUS,B.
The Cellular Distribution of Erythrocyte and Normoblast A_1 and A Antigens in Normal and Preleukemic States. An Immunoelectron Study
Blood Cells, 2, 221, 1976

50. FISCHER,K. and STEGE,N.
On the Pathogenesis of ABO Erythroblastosis: Demonstration of Quantitative Variations in the Power of Neonatal Erythrocytes to Combine with Antibody, Using the Immuno-fluorescent Technique
Vox Sang. 12, 145, 1967

51. KLEIHAUER,E., BRAUN,H. und BETKE,K.
Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrozyten eines Blutausstrichs
Klin.Wschr. 35, 635, 1957

52. FUJISAWA,K., FURUKAWA,K. and JSEKI,S.
Chemical Effects of A and B Decomposing Enzymes on Blood Group Substances from Red Cells
Proc.Japan.Acad. 39, 3119, 1963

53. CARTRON,J.P., GERBAL,A., HUGHES-JONES,N.C. and SALMON,C.
'Weak A' Phenotypes. Relationship between Red Cell Agglutinability and Atigen Site Density
Immunology 27, 723, 1974

54. HOLBURN,A.M.
Radioimmunoassay Studies of the Cross-Reaching Antibody of Human Group O Sera
Brit.J.Haematol. 32, 589, 1976

55. WAGNER,M. und WAGNER,B.
Elektronenmikroskopischer Nachweis der Blutgruppensubstanz A auf menschlichen Erythrozyten mit ferritin- und goldmarkiertem Protektin von Helix pomatia
Z.Immun.-Forsch. 151, 117, 1976

56. ECONOMIDOU,J., HUGHES-JONES,N.C. and GARDNER,B.
The Functional Activities of IgG and IgM Anti-A and Anti-B
Immunology 13, 227, 1967

57. ROCHNA,E. and HUGHES-JONES,N.C.
The Use of Purified ^{125}I-labelled Anti-gamma-Globulin in the Determination of the Number of D Antigen Sites on Red Cells of Different Phenotypes
Vox Sang. 10, 675, 1965

58. HUGHES-JONES,N.C., GARDNER,B. and LINCOLN,P.J.
Observations of the Number of Available C, D and E Antigen Sites on Red Cells
Vox Sang. 21, 210, 1971

59. HUGHES-JONES,N.C. and GARDNER,B.
The Kell System Studied with Radioactively-labelled Anti-K
Vox Sang. 21, 154, 1971

60. ROCHANT,H., TONTHAT,H., HENRI,A., TITEUX,M. and DREYFUS,B.
Abnormal Distribution of Erythrocytes A_1 Antigens in Preleukemia as Demonstrated by an Immuno-fluorescence Technique
Blood Cells 2, 237, 1976

61. REARDEN,A. and MASOURELIS,S.P.
Blood Group D Antigen Content of Nucleated Red Cell Precursors
Blood 50, 981, 1977

62. PIOMELLI,S., LURINSKY,G. and WASSERMAN,L.R.
The Mechanism of Red Cell Aging.
I. Relationship between Cell Age and Specific Gravity Evaluated by Ultra-Centrifugation in a Discontinuous Density Gradient
J.Lab.Clin.Med, 69, 659, 1967

63. LEIF,R.C. and VINOGRAD,J.
The Distribution of Buoyant Density of Human Erythrocytes in Bovine Albumin Solutions
Biochemistry Proc.N.A.S. 51, 520, 1964

64. KEY,A.J.
Studies on Erythrocytes, with Special Reference to reticulum, polychromatophilia and mitochondria
Arch.Int.Med. 28, 511, 1921

65. BORUN,E.R., FIGUEROA,W.G. and PERRY,S.M.
The Distribution of Fe^{59} tagged Human Erythrocytes in Centrifuged Specimens as a Function of Cell Age
J.Clin.Invest. 36, 676, 1957

66. DANON,D. et MARIKOVSKY,Y.
Différence de Charge Electrique de Surface entre Erythrocytes Jeunes et Agés
C.R.Acad.Sci. 253, 1271, 1961

67. MARIKOVSKY,Y., DANON,D. and KATCHALSKY,A.
Agglutination by Polylysine of Young and Old Red Blood Cells
Biochim.Biophys.Acta 124, 154, 1966

68. MARIKOVSKY,Y and DANON,D.
Agglutination of Young and Old Human Red Cells by Blood Group Antibodies
Vox Sang. 20, 174, 1971

69. GREENWALT,T.J., FLORY,L.L. and STEANE,E.A.
Quantitative Haemagglutination
III. Studies of Separated Populations of Human Red Blood Cells of Different Densities
Brit.J.Haematol. 19, 701, 1970

70. WINKELSTEIN,J.A. and MOLLISON,P.L.
The Antigen Content of 'inagglutinable' Group B Erythrocytes
Vox Sang. 10, 614, 1965

71. VERDIER,de C.H., GARBY,L., KILLANDER,J., HJELM,M. and HÖGMAN,C.F.
The Relation between the Age of Red Cells labelled with Radio-Iron and Haemolysis Induced by Mechanical Trauma and Rapid Freezing-Thawing
Vox Sang. 8, 660, 1963

72. DE WIT,C.D. and GASTEL v.,C.
Red Cell Age and Suspectibility to Immune Haemolysis
Scand.J.Haemat. 6, 373, 1969

73. FORNAINI,G.
Biochemical Modifications during the Life Span of the Erythrocyte
Ital.J.Biochem. 16, 257, 1967

74. COHEN,N.S., EKHOLM,J.E., LUTHRA,M.G. and HANAHAN,D.J.
Biochemical Characerization of Density-separated Human Erythrocytes
Biochim.Biophys.Acta 419, 229, 1976

75. REYES,F.
Discussion of Papers by SALMON, GOURDIN et al. and ROCHANT et al.
Blood Cells 2, 253, 1976

76. REARDEN,A. and MASOUREDIS,S.P.
Autoradiographic Estimation of Red Cell D Antigen Content Using ^{125}I-Anti-D and ^{125}I Membrane Labeling
Blood 50, 971, 1977

77. CONSTANDOULAKIS,M. and KAY,H.E.M.
A and B Antigens of the Human Foetal Erythrocyte
Brit.J.Haemat. 8, 57, 1962

78. CONSTANDOULAKIS,M. and KAY,H.E.M.
Observations on the A_2 Gene and H Antigen in Foetal Life
Brit.J.Haemat. 9, 63, 1963

79. SPEISER,P.
Die Bedeutung der Blutgruppenserologie für das Neugeborene
Wiener Med.W'schr. 12, 185, 1975

80. LOGHEM,J.J.van, DORFMEIER,H. and v.d.HART,M.
Two A Antigens with Abnormal Serologic Properties
Vox Sang. 2, 16, 1957

81. WIENER,A.S. and GORDON,E.B.
A hitherto Undescribed Human Blood Group Am.
Brit.J.Haemat. 2, 305, 1956

82. BUCHHOLZ,D. and BOVE,J.R.
Quantitative Hemagglutination: Alterations in Red Cell Reactivity
Transfusion 7, 369, 1967

83. CALLENDER,S.T., KAY,H.E.M., LAWLER,S.D., MILLARD,R.E., SANGER,R., TIPPETT,P.A.
Two Populations of Rh Groups together with Chromosomally Abnormal Cell Lines in the Bone Marrow
Brit.Med.J., i, 131, 1971

84. BIRD,G.W.G., WINGHAM,J., CHESTER,G.H., KIDD,P. and PAYNE,R.W.
Erythrocyte Membrane Modification in Malignant Disease of Myeloid and Lymphoreticular Tissues
II. Erythrocyte 'Mosaicism' in Acute Erythroleukaemia
Brit.J.Haemat. 33, 295, 1976

85. KAHN,A., BOIVIN,P., WROKLANS,M. and HAKIM,J.
Erythroleukémie avec Double Population Erythrocytaire: Coexistence dans une Même Population d'un Affaiblissement d'un Antigène de Group, d'un Déficit Majeur en Adenylate-Kinase et d'une Augmentation de la Fraction A_2 de l'Hémoglobine
Nouv.Rév.Franc. d'Hémat. 12, 609, 1972

86. SCOTT,G.L. and RASBRIDGE,M.R.
Loss of Blood Group Antigenicity in a Patient with Hodgkins's Disease
Vox Sang. 23, 458, 1972

87. HOOGSTRAATEN,B., ROSENFIELD,R.E. and WASSERMAN,L.R.
Change of ABO Blood Type in a Patient with Leukemia
Transfusion, Philadelph. 1, 32, 1961

88. HART,M.v.d., VEER,M.v.d., LOGHEM,J.J.van
Change of Blood Group B in a Case of Leukaemia
Vox Sang. 7, 449, 1962

89. RICHARDS,A.G.
Loss of Blood-Group-B Antigen in Chronic Lymphatic Leukaemia
Lancet 28, 178, 1962

90. TOVEY,G.H.
Changes in the Group A Antigen in Leucaemia
Proc. 7th Congr.Europ.Haemat., London 1959
part II,pp.1167-70,1960

91. SALMON,Ch.
Blood Groups Changes in Preleukemic States
Blood Cells 2, 211, 1976

92. MAJSKY,A. und BRABEC,V.
Zur Frage der Ursache von spontanen Agglutinabilitätsveränderungen des A-Erythrozytenantigens bei Kranken mit akuten Leukämien
Fol.Haemat.78, 237, 1961

93. SALMON,Ch., DREYFUS,B. et ANDRE,R.
Double Population des Globules Different seulement par l'Antigène de Groupe ABO, observée chez un Malade Leucémique
Rev.Hémat. 13, 148, 1958

94. GOLD,E.R., TOVEY,G.H., BENNEY,W.E. and LEWIS,F.J.W.
Changes in the Group A Antigen in a Case of Leukaemia
Nature 183, 892, 1959

95. CROWLEY,L.V. and MUNKITTRICK,R.C.
ABO Blood Group Alterations in Leukaemia
Cand.M.A.J. 83, 216,1960

96. SALMON,C., ANDRE,R. et DREYFUS,B.
Arguments en Faveur de Mutations Somatiques du Gène de Groupe Sanguin A au cours de Certaines Leucémies Aiguës
Proc. 7th Congr.Europ.Soc.Haemat., London 1959
Part II, 1171, 1960

97. BARTOVA,A., NOVOTNY,Z. and SLEPICKA,J.
Changes in the Group A Antigen in a Case of Acute Leukemia
Blood 19, 566, 1962

98. POSCHMANN,A., FISCHER,K., WINKLER,K. and LANDBECK,G.
Alterations of Blood Group Receptors of Erythrocytes in Leukemia-Immunofluorescence Studies
Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas, p. 353
Thierfelder,S., Rodt,H. and Thiel,E. (eds.)
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977

99. AYRES,M., SALZANO,F.M. and LUDWIG,O.K.
Blood Group Changes in Leukaemia
J.med.Genet. 3, 180, 1966

100. RENTON,P.H. and HANCOCK,J.A.
Uptake of A and B Antigens by Transfused Group O Erythrocytes
Vox Sang. 7, 35, 1962

101. SCHENKEL-BRUNNER,H. and TUPPY,H.
Enzymatic Conversion of Human O into A Erythrocytes and of B into AB Erythrocytes
Nature 223, 1272, 1969

102. RENTON,P.H., STRATTON,F., GUNSON,H.H. and HANCOCK,J.A.
Red Cells of All Four ABO Groups in a Case of Leukaemia
Brit.Med.J. I, 294, 1962

103. SHERIDAN,B.L., WEATHERALL,D.J., CLEGG,J.B. PRITCHARD,J., WOOD,W.G., CALLENDER,S.T., DURRANT,I.J., McWHIRTER,W.R., ALI,M., PARTRIDGE,J.W. and THOMPSON,E.N.
The Patterns of Fetal Haemoglobin Production in Leukaemia
Brit.J.Haemat. 32, 487, 1976

104. DOVER,G.J., BOYER,S.H., ZINKHAM,W.H., KAZAZIAN,H.H.jr., PINNEY,D.J. and SIGLER,A.
Changing Erythrocyte Populations in Juvenile Chronic Myelocytic Leukemia: Evidence for Disordered Regulation
Blood 49, 355, 1977

105. ADAMSON,J.W., FIALKOW,P.J., MURPHY,S., PRCHAL,J.F. and STEINMANN,L.
Polycythemia vera: Stem Cell and probable Clonal Origin of the Disease
N.Eng.J.Med. 295, 913, 1976

106. PAPAYANNOPOULOU,Th., BRICE,M. and STAMATOYANNOPOULOS,G.
Hemoglobin F Synthesis in vitro: Evidence for Control at the Level of Primitive Erythroid Stem Cells
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 2923, 1977

107. BOYER,S.H., BOYER,M.L., NOYES,A.N. and BELDING,T.K.
Immunological Basis for Detection of Sickle Cell Hemoglobin Phenotypes in Amniotic Fluid Erythrocytes
Ann.N.Y.Acad.Sci. 241, 699,1974

108. WOOL,W.G., STAMATOYANNOPOULOS,G., LIM,G. and NUTE,P.E.
F Cells in the Adult: Normal Values and Levels in Individuals with Hereditary and Acquired Elevations of HbF
Blood 46, 671, 1975

L E B E N S L A U F

12.2.1949	geboren in Schwäbisch Hall als zweiter Sohn des Lehrers Hans Kissling und dessen Ehefrau Lieselotte Kissling, geb. Haag.
1955-1959	Besuch der Volksschule in Westheim, Kreis Schwäbisch Hall.
1959-1967	Besuch des Gymnasiums b.St.Michael in Schwäbisch Hall.
7.6.1967	Reifeprüfung
1967-1973	Studium der Tiermedizin an der Universität München.
17.5.1973	Bestallung als Tierarzt
1972	Beginn des Medizinstudiums an der Universität München.
4.3.1975	Ärztliche Vorprüfung.
Juli 1978	Ärztliche Prüfung.
1.8.78 - 31.1.79	Medizinalassistentenzeit an der I.Med.Klinik des Städt.Krankenhauses München-Schwabing Chefarzt:Prof.Dr.Begemann
seit 15.2.79	Medizinalassistentenzeit am Marienhospital Latmathe,Chirurg.Abt. Chefarzt:Dr.med.B.Dreischulte